

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

ESTUDIO TAXÓNOMICO DE AEROMONAS MÓVILES Y  
SALICINA NEGATIVAS

LÁZARA VALERA AMADOR

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan M. Tomás Magaña
- D<sup>a</sup>. María José Figueras Sanz
- D. Antonio J. Martínez Murcia
- D. Antonio Ventosa Uceró
- D<sup>a</sup>. Elena Alcaide Moreno

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. María Consuelo Esteve Sánchez

D<sup>a</sup>. María Dolores García López

©Copyright: Servei de Publicacions  
Lázara Valera Amador

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6778-0

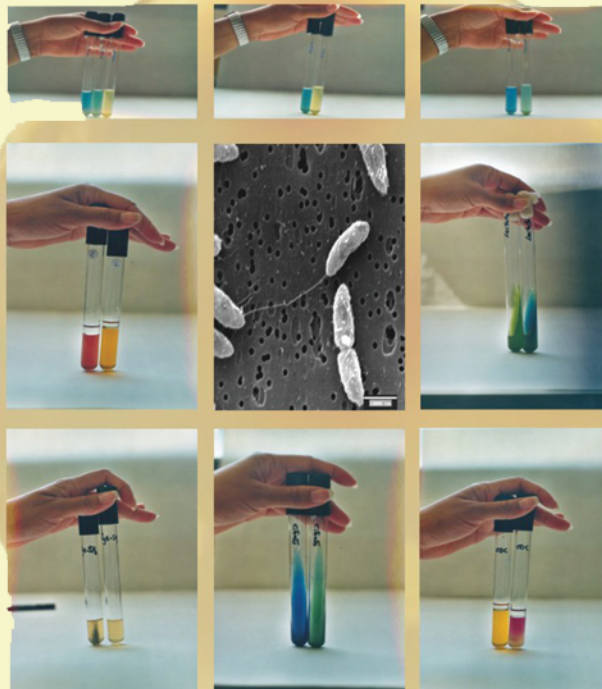
Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“ESTUDIO TAXONÓMICO DE AEROMONAS  
MOVILES Y SALICINA NEGATIVAS”**

**TESIS DOCTORAL  
LAZARA VALERA AMADOR**



**VALENCIA 2006**

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.



“ESTUDIO TAXONÓMICO DE *AEROMONAS*  
MÓVILES Y SALICINA NEGATIVAS.”

**Tesis Doctoral**  
**Lazara Valera Amador**  
**2006**

Fotografías de la portada: células de *Aeromonas* en diferentes medios de cultivo, durante la realización de pruebas bioquímicas. De izquierda a derecha resultados obtenidos en caldo malonato, malato, en ácido maleico, pruebas de arginina dihidrolasa, citrato, producción de sulfhídrico a partir de cisteína y ornitina descarboxilasa. Al centro, microfotografía de Microscopía electrónica de barrido en células de *Aeromonas jandaei* en división, crecidas en TSB suplementado.

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Departamento de Microbiología y Ecología

“ESTUDIO TAXONÓMICO DE *AEROMONAS*  
MÓVILES Y SALICINA NEGATIVAS.”

Memoria presentada por  
**Lázara Valera Amador**  
Para optar al grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas por la  
Universidad de Valencia

Fdo. Lázara Valera Amador

Dirigida por la **Dra. M<sup>a</sup> Consuelo Esteve Sánchez**  
y la **Dra. M<sup>a</sup> Dolores García López.**

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Consuelo Esteve

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Dolores García.

Valencia, septiembre de 2006.

***“LA LIBERTAD CUESTA MUY CARA, Y ES  
NECESARIO, O RESIGNARSE A VIVIR SIN  
ELLA, O DECIDIRSE A COMPRARLA POR  
SU PRECIO”.***

**José Martí.**

*A mi grandiosa familia.  
Especialmente a Rosa y Eduardo.*



## **Agradecimientos.**

Agradezco por este medio a cuantas personas e instituciones han podido contribuir en la realización y culminación de este trabajo.

Agradezco a mis directoras de Tesis, María Consuelo Esteve Sánchez y María Dolores García López, la colaboración y atención prestada; los conocimientos que he incorporado en mi haber durante estos años de trabajo y aprendizaje, así como el rigor científico con que se ha desarrollado el mismo.

*In memoria* a Don Federico Uruburu Fernández el haber sido mi mentor e iniciador de esta larga trayectoria como *Curator*, sus sanos y desinteresados consejos profesionales y humanos.

A mis compañeras y amigas durante mi estancia y permanencia en esta institución: Ester Marco, su buen hacer, su amabilidad permanente y su excelente capacidad profesional; Teresa Bosque Weiser vocación, ciencia y cultura en una misma proporción; A Marian Yago su colaboración desinteresada, su esfuerzo y sus deseos de aprendizaje incondicionales. A ellas tres por demás mis agradecimientos especiales por ser las *hadas madrinas*

de Cecilia y Mario. A Belén también, sus consejos profesionales y nuestras tertulias infantiles. A ellas mis mejores deseos de bienestar, prosperidad y que por siempre sigan siendo como hasta el día de hoy, excelentes amigas

Agradezco también y sin desmeritar el esfuerzo de todos los colaboradores, estudiantes y actuales doctorandos, que han alegrado los laboratorios, pasillos y las tertulias culturales en la hora del café, a ellos también muy buena suerte y sin esperar olvidar ningún nombre o herir sensibilidades, me remonto a tiempos antaño: la Dra Lolex, los candidatos: Eva, Mariola, Paco, Esmeralda, Sonia y Roberto, muchas gracias, por todo.

Quiero agradecer además y de una forma especial a las Doctoras Elena Alcalde Moreno y Carmen Amaro, la atención y colaboración prestada durante este tiempo.

A la Dra. Elena Gonzáles Biosca sus pertinentes y útiles consejos profesionales y su visión objetiva de mis dudas existenciales.

Un agradecimiento muy especial a Don Antonio Ventosa y a Doña Maria de Carmen Gutiérrez,

de la Universidad de Sevilla, por su amabilidad, sugerencias, consejos y disposición incondicional en el desarrollo de una parte muy importante de esta tesis doctoral.

Quiero por demás agradecer a todos los miembros del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, la colaboración prestada. A la CECT y a todos sus miembros su cálida acogida y la amistad que perdura con buena parte de su antiguos miembros, entre ellos, Laura, Braulio, Pedro y Sonia Wolsky.

A los miembros del Servicio de Microscopía Electrónica, Tomás y Pilar por su excelente asistencia técnica y gentil trato.

A Vicente, José Manuel, a los Luises y a Amparo, miembros también del Departamento, por la prestación de sus servicios, ayuda “generosa y cautiva”, además de las sesiones de terapia de risa a costa de los “intercambios interculturales y lingüísticos”. Gracias por ser mis “compis”.

A Maela León Santana, Yoanna Ariosa , Nelly O’Farrill, Gema, Odalmis, Ana, Vivian “las invasoras” y a Teresa, Merche, Silvina, Eliza, Natxo,

Iñaki, JuanJo, Pepón y Ricardo por apoyarme incondicionalmente en mis más duros momentos, por entenderme y darme el apoyo y la calidez que he necesitado, incluso a nivel personal reforzándome el espíritu combativo, de lucha y la perseverancia que nos caracteriza, agradezco además su incondicional “amistad con grado”.

Agradezco además a todas las instituciones que han hecho posible con su financiamiento, la realización de este trabajo. A la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CYCIT) de Ministerio de Educación y Ciencia, por el proyecto BI095-2064-E; a la Secretaría de Estado para la Cooperación internacional y para Ibero América, Agencia Española de Cooperación Iberoamericana, del Ministerio de Asuntos Exteriores. La ayuda concedida para la iniciación de mi especialización y a Consellería de las Naciones Unidas (UNESCO) por el proyecto SC/BS/LS/ BAC-MIRCEN, que posibilitó parte de mi estancia y resultados de este trabajo.

A mi familia por estar siempre presentes, aun en la distancia, junto a mi. Especialmente mis padres y mis hermanos.

A Antonio su apoyo profesional y el ser mi  
compañero, además.

A Cecy que vivió aun en mi vientre parte del  
desarrollo de este trabajo y a Mayi que no por venir  
después, es menos importante en este trabajo y en las  
metas trazadas en mi vida. Para ellos y por ellos, lo  
mejor de mi.

*“Honrar, honra”.*

**José Martí**

**ABREVIATURAS EMPLEADAS.**

µg.....	Microgramo.
µl.....	Microlitro.
µm.....	Micrómetro.
µM.....	Micromolar.
ΔTM.....	Incremento de la temperatura de desnaturalización.
16S rRNA.....	Subunidad 16S del RNA ribosómico.
16S rDNA-RFLP.....	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico.
16S-23S ISR.....	Espaciador intergénico 16S-23S.
AFLP.....	Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados ('Amplified fragment length polymorphisms').
ATCC.....	Colección Americana de Cultivos Tipo ('American Type Culture Collection').
ADH.....	Arginina dihidrolasa.
CCM.....	Czechoslovak Collection of Microorganisms.
CDC.....	<i>Centers for Disease Control, United States Public Health Services</i> , Atlanta. Estados Unidos.
CECT.....	Colección Española de Cultivos Tipo.
CHEF.....	<i>Contour-clamped homogeneous field electrophoresis</i> .
DNA.....	Ácido desoxiribonucleico.
DNAsa.....	Desoribonucleasa.
DHGs.....	Grupos de hibridación DNA.
DO.....	Densidad óptica.
FAMES.....	Fatty acid methyl esters. (Cromatografía gas-líquido para analizar ésters metílicos de ácidos grasos celulares).
Fig./FIG.....	Figura.

---

GCF.....	Medio gelatina-cisteína-tiosulfato para ver producción de sulfhídrico.
HGs.....	Grupos de hibridación
H.....	Hora/s.
IJSB.....	Revista Internacional de Sistemática Bacteriana.
KDa.....	KiloDalton/s.
LPS.....	Lipopolisacárido/s.
min.....	Minuto/s
NCIMB.....	Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales. ( <i>National Collection of marine and Industrial Bacteria</i> ).
N.M.P.....	Número más probable.
NTSYS-PC.....	Sistema estadístico de análisis numérico y de multivarianzas.
ODC.....	Ornitina Descarboxilasa.
ONPG.....	O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
O/129.....	2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (Agente vibriostático).
°C.....	Grados centígrados.
p/v.....	Relación peso-volumen.
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa.
PFGE.....	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis de campo pulsante).
RAPID.....	DNA polimórfico amplificado al azar ( <i>'Randomly amplified polymorphic DNA'</i> ).
RNA.....	Ácido ribonucleico.
r.p.m.....	Revoluciones por minuto.
SDS.....	Dodecil Sulfato de sodio-agar-
TBS.....	Solución tamponada con Tris ( <i>'Tris buffer solution'</i> ).
TCBS.....	Tiosulfato-citrato-bilis (Sales biliares)-sacarosa-agar.
Tris.....	Tris-(hidroximetil)-aminometano.



TSA.....	Agar Triptona Soya.
TSB.....	Caldo Triptona Soya.
ufc.....	Unidades formadoras de colonias.
UPGMA.....	<i>Unweigh Pairgroup Metod wiht Arithmetic Averages</i> (Análisis de agrupamientos por ligamiento promedio).
V.....	Volúmen.

## INTRODUCCIÓN

1. El género <i>Aeromonas</i> : Nomenclatura y perspectiva histórica.....	1-6
2. Grupos de hibridación y filogenia.....	6-16
3. Estructura taxonómica del género <i>Aeromonas</i> en la actualidad.....	17
3.1 Familia <i>Aeromonadaceae</i> (Género <i>Aeromonas</i> ). Caracteres generales.....	17-18
3.2 Especies del género <i>Aeromonas</i> .....	19
3.2.1. <i>A. hydrophila</i> .....	23-24
3.2.2. <i>A. bestiarum</i> .....	24-25
3.2.3. <i>A. salmonicida</i> .....	25
3.2.4. <i>A. caviae</i> .....	26
3.2.5. <i>A. media</i> .....	26-27
3.2.6. <i>A. eucrenophila</i> .....	28-30
3.2.7. <i>A. sobria</i> .....	30
3.2.8. <i>A. jandaei</i> .....	31
3.2.9. <i>A. veronii</i> .....	31-33
3.2.10. <i>A. schubertii</i> .....	33-34
3.2.11. <i>A. trota</i> .....	34
3.2.12. <i>A. allosacharophila</i> .....	35-36
3.2.13. <i>A. encheleia</i> .....	36-38
3.2.14. <i>A. popoffii</i> .....	38-39
3.2.15. <i>A. ichtiosmia</i> .....	40
3.2.16. <i>A. enteropelogenes</i> .....	41
3.2.17. <i>A. culicicola</i> .....	41-42
3.2.18. <i>A. simiae</i> .....	43
3.2.19. <i>A. molluscorum</i> .....	43-44
<b>3 Sistemas de identificación en <i>Aeromonas</i>.....</b>	<b>45</b>

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56-57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58-87</b>
<b>1. Caracterización fenotípica y análisis numérico.....</b>	<b>58</b>
1.1. Cepas bacterianas.....	58
1.2. Conservación y mantenimiento de las cepas.....	65
1.3. Caracterización fenotípica.....	65-69
1.4. Codificación de los datos.....	69
1.5. Cálculo del error experimental.....	69
1.6. Análisis numérico.....	70-72
1.7. Microscopía electrónica.....	72-73
<b>2. Caracterización genética mediante hibridación del DNA y estudio de su composición en bases guanina y citosina.....</b>	<b>73</b>
2.1. Cepas bacterianas.....	73
2.2. Aislamiento y purificación del DNA de las células bacterianas.....	74-77
2.3. Valoración del porcentaje G+C del DNA bacteriano.....	77
2.4 Hibridación DNA-DNA (Técnica de hibridación competitiva sobre DNA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa).....	78
2.4.1 Diseño de los experimentos de hibridación.....	79
2.4.2 Inmovilización del DNA de referencia en membrana de nitrocelulosa.....	80
2.4.3 Marcaje radiactivo del DNA de referencia (sonda).....	81
2.4.4 Preparación de los DNAs competidores (DNA frío).....	81
2.4.5 Hibridación: Mezclas de reacción, condiciones de incubación y lavado.....	82
2.4.6 Evaluación de los porcentajes de homología DNA/DNA.....	87
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
<b>1. Taxonomía numérica de las cepas de <i>Aeromonas</i>.....</b>	<b>88</b>

1.1. Similaridad entre cepas duplicadas.....	88-90
1.2. Selección de caracteres en función de su reproducibilidad.....	90
1.3 Evaluación del error experimental.....	90
1.4 Selección de caracteres en función de su poder discriminatorio .....	92-93
1.5. Agrupamiento de las OTU'S mediante UPGMA.....	93-97
1.6 Comparación de los resultados obtenidos con los coeficientes $S_{SM}$ y $S_J$ . .....	98-101
1.7 Descripción de los fenones. Análisis $S_J$ /UPGMA.....	104-114
1.8 Composición genotípica de los fenones.....	114-115
1.9 Caracteres diferenciales.....	115-120
1.10 Morfología celular.....	120-122
1.11 Discusión.....	122-127
 <b>2. Hibridación DNA-DNA entre cepas representativas de las especies</b>	
<b><i>A.jandaei</i>, <i>A. ichtiosmia</i> y <i>A.veronii</i>.....</b>	<b>127</b>
2.1. Contenido en bases Guanina-citosina (% G+C) del DNA de las cepas de <i>Aeromonas</i> .....	128-129
2.2. Homología genómica entre las cepas de <i>Aeromonas</i> .....	129-134
2.3. Enmienda a la descripción de la especie <i>A.jandaei</i> .....	135-137
2.4. Diferenciación fenotípica de la especie <i>A.jandaei</i> .....	137-138
2.5. Importancia clínica y patogenicidad de la especie <i>A.jandaei</i> .....	138-141
 <b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	
<b>142-144</b>	
 <b>ANEXOS.....</b>	
<b>145</b>	
<b>1. Soluciones y tampones.....</b>	<b>146-152</b>
<b>2. Medios de Cultivo.....</b>	<b>152-163</b>
<b>3. Reactivos y discos de lectura.....</b>	<b>163-165</b>
<b>4. Colorantes y tinciones.....</b>	<b>165-166</b>
<b>5. Matriz de datos fenotipicos.....</b>	<b>167-173</b>

6. Matriz de similaridad obtenida con el coeficiente $S_{SM}$ .....	174-223
7. Matriz de similaridad obtenida con el coeficiente $S_J$ .....	224-273
8. Dendrograma obtenido mediante UPGMA, coeficiente $S_{SM}$ para cepas de estudio de hibridación DNA-DNA.....	274
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	275-318

**INDICE DE TABLAS.**

<b>Tabla nº1.</b> Sinonimias en el género <i>Aeromonas</i> .....	2
<b>Tabla nº2.</b> Cuadro resumen de la taxonomía del género <i>Aeromonas</i> .....	4
<b>Tabla nº3.</b> Genospecies y fenospecies existentes dentro del género <i>Aeromonas</i> .....	9
<b>Tabla nº4.</b> Niveles de homología DNA-DNA reportados en la bibliografía para la diferentes especies, cepas tipo y de referencia de <i>Aeromonas</i> .....	15-16
<b>Tabla nº5.</b> Familia Vibrionaceae. (Según Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9ª Edición).....	18
<b>Tabla nº6.</b> Características fenotípicas diferenciales descritas para <i>Aeromonas</i> por sus autores.....	21-22
<b>Tabla nº7.</b> Cepas de referencia del género <i>Aeromonas</i> incluidas en este estudio(incluyen datos de homología publicados).....	59-61
<b>Tabla nº8.</b> Otras cepas del género <i>Aeromonas</i> utilizadas en este estudio.....	62-64
<b>Tabla nº9.</b> Cepas incluidas en el estudio genómico (n= 29).....	74
<b>Tabla nº10.</b> Similaridad $S_{SM}$ entre cepas duplicadas.....	91
<b>Tabla nº11.</b> Probabilidades medias de error estimadas como $S_i^2$ .....	92
<b>Tabla nº12.</b> Caracteres invariantes para las cepas de <i>Aeromonas</i> estudiadas.....	94
<b>Tabla nº13.</b> Similaridad $S_{SM}$ entre cepas tipo y cepas de referencia de grupos de hibridación. ....	96
<b>Tabla nº14.</b> Similaridad $S_J$ entre cepas tipo y cepas de referencia de grupos de hibridación.....	97
<b>Tabla nº15.</b> Cuadro resumen de los resultados del análisis numérico.....	99
<b>Tabla nº16.</b> Características de los fenones definidos por el análisis $S_J$ /UPGMA a un nivel de similaridad del 81,6%. ....	103-106
<b>Tabla nº17.</b> Composición genotípica de los fenones (Análisis de UPGMA).....	116
<b>Tabla nº18.</b> Caracteres con valor diagnóstico para la identificación de <i>Aeromonas</i> .....	117-119

---

<b>Tabla n°19.</b> Valores del contenido en G+C y de $T_M$ para los DNAs de cepas estudiadas.....	130
<b>Tabla n°20.</b> Porcentos de hibridación DNA-DNA y composición de bases de DNA para <i>A.jandaei</i> y las especies relacionadas .....	134
<b>Tabla n°21.</b> Características variables de la especie <i>A.jandaei</i> y su distribución en dependencia del origen de las cepas.....	137
<b>Tabla n°22.</b> Claves de diferenciación fenotípica para la especie <i>A.jandaei</i> .....	139

**INDICE DE FIGURAS.**

<b>Figura nº1.</b> Pruebas fisiológico bioquímicas generales en placas para identificación y caracterización de <i>Aeromonas</i> (NCTC).....	48
<b>Figura nº2.</b> Pruebas fisiológico bioquímicas generales en tubos.(NCTC).....	50
<b>Figura nº3.</b> Resultados obtenidos en Agar Triptona Soya (TSA).Producción de pigmento marrón difusible, en cepas <i>Aeromonas</i> .....	88
<b>Figura nº4.</b> Resultados obtenidos en pruebas fisiológico-bioquímicas para las diferentes especies y grupos de hibridación en <i>Aeromonas</i> .....	89
<b>Figura nº5.</b> Resultados obtenidos en pruebas fisiológico-bioquímicas para <i>Aeromonas</i> .....	90
<b>Figura nº6.</b> Dendrograma obtenido en análisis S <sub>J</sub> /UPGMA.....	100
<b>Figura nº7.</b> Dendrograma S <sub>SM</sub> /UPGMA.....	101
<b>Figura nº8.</b> Microfotografía de tinción negativa en cepa tipo de <i>A.jandaei</i> . CECT 4228 <sup>T</sup> .....	120
<b>Figura nº9.</b> Microfotografía de scanning de <i>Aeromonas jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup> .....	121
<b>Figura nº10.</b> Microfotografías electrónicas de transmisión, tinción negativa de cepa <i>A.jandaei</i> .....	122

**INDICE DE ESQUEMAS.**

<b>Esquema nº1.</b> Protocolo de extracción de DNA bacteriano.....	76-77
<b>Esquema nº2.</b> Experimentos de hibridación.....	79
<b>Esquema nº3.</b> Protocolo de marcaje radiactivo <b>in vitro</b> del DNA.....	83
<b>Esquema nº4.</b> Protocolo de hibridación.....	86



## **EL GÉNERO *Aeromonas*: NOMENCLATURA Y PERSPECTIVA HISTÓRICA.**

En la actualidad el género *Aeromonas*, incluye bacilos Gram negativos, oxidasa positivos, heterótrofos y anaerobios facultativos que poseen una amplia distribución en medios acuáticos, principalmente dulceacuícolas. Con relación a esto, *Aeromonas* ha sido descrita, por una parte, como componente de la microbiota asociada a animales poiquilotermos, y por otra, como patógeno de peces y del ser humano en enfermedades de transmisión hídrica.

La nomenclatura y clasificación de este género puede ubicarse históricamente en tres periodos. El primer periodo incluye los años 1890-1936, momento en el que muchos nombres fueron propuestos para cepas aisladas de gran variedad de orígenes y enfermedades, como por ejemplo la especie *Bacillus hydrophilus fuscus* (Sanarelli, 1891) aislada de tejido ganglionar, en un estudio de inmunidad en ranas, la cual se considera como la primera descripción de un aislamiento de *Aeromonas*.

Otros estudios fueron realizadas a partir de muestras de aguas (Beijerinck, 1900, Zimmerman, 1890), de leche (Hammer, 1917) ó de truchas muertas (Emmerich y Weibel, 1894). En este periodo los métodos de identificación y caracterización fueron muy primitivos, lo que dificultó, determinar si autores diferentes describían acerca del mismo microorganismo, de hecho actualmente se conoce que muchas de las especies descritas entonces, son sinónimo de una misma especie de *Aeromonas*. (Tabla nº1 y Tabla nº2).

**Tabla n°1.** Sinonimias en el género *Aeromonas*.

Especie	Sinónimo	Referencia <sup>a</sup>
<i>A. hydrophila</i>	<i>Bacillus hydrophilus fuscus</i>	Sanarelli, 1891.
	<i>B. ranicida</i> . Ernst	Lehman y Newmann, 1896.
	<i>Aerobacter liquefaciens</i>	Beijerinck, 1900.
	<i>B. hydrophilus</i> Sanarelli	Chester, 1901.
	<i>B. ichthyosmius</i>	Hammer, 1917.
	<i>Proteus hydrophilus</i> Chester	Bergey y cols., 1923.
	<i>Escherichia ichthyosmius</i>	Bergey y cols., 1923 <sup>b</sup>
	<i>Bacterium hydrophilum</i>	Weldin y Levin, 1923 <sup>b</sup> .
	<i>Pseudomonas fermentans</i>	Wohlzogen-Kühr, 1932 <sup>b</sup> .
	<i>Escherichia icteroides</i>	Pribham, 1933 <sup>b</sup>
	<i>Proteus ichtyosmia</i> Hammer	Bergey y col., 1934
	<i>Flavobacterium fermentans</i>	Bergey y col., 1934
	<i>Aeromonas liquefaciens</i>	Kluyver y Van Niel, 1936.
	<i>Proteus melanovógenes</i>	Miles y Halnan, 1937
	<i>Vibrio jamaicensis</i>	Caselitz, 1955.
<i>A. caviae</i>	<i>Bacillus punctatus</i>	Zimmerman, 1890.
	<i>Bacterium punctatum</i>	Lehmann y Newmann, 1896
	<i>Achromobacter punctatum</i>	Bergey y cols., 1934.
	<i>Pseudomonas caviae</i>	Scherago, 1936.
	<i>Pseudomonas punctata</i>	Breed y cols., 1948 <sup>b</sup> .
	<i>Pseudomonas formicans</i>	Crawford, 1954 <sup>b</sup> .
	<i>Aeromonas formicans</i>	Pivnick y Sabina, 1957.
<i>A. salmonicida</i>	<i>Bacillus de trucha pestilente</i>	Emmerich y Weibel, 1894
	<i>Bacterium salmonicida</i>	Lehman y Newmann, 1896.
	<i>Proteus salmonicida</i>	Pribham, 1933 <sup>b</sup> .
	<i>Necromonas achromogenes</i>	Smith, 1963.
<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. punctata</i> .	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. enteropelogenes</i>	<i>A. trota</i>	Collins y cols. 1993 <sup>a</sup> ; Huys y cols. 2002b
<i>A. veronii</i>	<i>A. ichtiosmia</i>	Collins y cols. 1993 <sup>a</sup> ; Huys y cols. 2001.
	<i>A. culicicola</i> .	Huys y cols 2005

<sup>a</sup>) Referencias incluidas en la bibliografía.

<sup>b</sup>) Referencias tomadas de "The genus *Aeromonas*" Editada por Austin y cols. (1996).

El nombre *Aeromonas* (“unidad productora de gas”), fué acuñado por Kluyver y Van Niel (1936) dentro de su “sistema natural de clasificación bacteriana”, no obstante tomó su tiempo antes de que *Aeromonas* fuera propuesto y aceptado como género.

La sexta edición de “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Breed y cols, 1948) aún no incorpora *Aeromonas* como género sino que las cepas actualmente clasificadas como *Aeromonas*, quedaron clasificadas dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Bacterium* mayoritariamente. (Tabla nº2.)

El género *Aeromonas* no apareció como taxón hasta la séptima edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Sniezsko, 1957); donde Sniezsko proponía cuatro especies, tres de ellas móviles (*A.hydrophila*, *A.punctata*, *A.liquefaciens*) y una inmóvil (*A.salmonicida*). (Tabla nº2)

Durante los años 60 y 70, estudios que incluían las cepas de referencia del género, redefinieron las especies de *Aeromonas* en base a criterios fenotipicos de producción de gas, Voges-Proskauer y oxidación de gluconato. Así, Pivnick y Sabina (1957) propusieron la división de la especie *A.hydrophila* en *A.formicans* (anaerógena) y *A.liquefaciens* (aerógena). Posteriormente, Eddy y Carpenter (1964) mostraron su desacuerdo con esta propuesta y destacaron que las *Aeromonas* móviles debían ser separadas en dos especies, *A.punctata* y *A. caviae*. Estos autores consideraron que la designación correcta para *A.hydrophila* y *A.liquefaciens* era *A.punctata*, mientras que el nombre *A.caviae* lo era para *A.formicans*.

**Tabla 2.** Cuadro resumen de la Taxonomía del género *Aeromonas*<sup>1</sup>.

	I.( 1890-1936)	II.(1936-1957)	III.(1967-1974)	IV.(1976-2005)
Familia		<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aeromonadaceae</i>
Género		<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>
Especies	<i>Ver Tabla 1</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i> .
Sinónimos		<i>A.punctata</i>	Subspecies.	<i>subespecie</i>
		<i>A.liquefaciens</i>	<i>hydrophila</i> .	<i>dhakensis</i>
			<i>anaerogenes</i> .	<i>ranae</i>
			<i>proteolytica</i> <sup>1</sup>	<i>A.caviae</i>
		<i>A.salmonicida</i>	<i>A.salmonicida</i> .	<i>A.salmonicida</i> .
			subespecies	subespecies
			<i>salmonicida</i> .	<i>salmonicida</i> .
			<i>achromogenes</i> .	<i>achromogenes</i>
			<i>.masoucida</i> .	<i>masoucida</i>
				<i>smithia</i>
				<i>pectinolytica</i>
				<i>A.sobria</i>
				<i>A.media</i>
				<i>A.veronii</i>
				<i>biogrupo veronii</i>
				<i>biogrupo sobria</i>
				<i>A.schubertii</i>
				<i>A.eucrenophila</i>
				<i>A.ichtiosmia</i>
				<i>A.enteropelogenes</i>
				<i>A.jandaei</i>
				<i>A.trota</i>
				<i>A.allosacharophila</i>
				<i>A.encheleia</i>
				<i>A.bestiarum</i>
				<i>A.popoffii</i>
				<i>A.culicicola</i>
				<i>A.simiae</i>
				<i>A.molluscorum</i>

<sup>1</sup>. Referencias incluidas en Bibliografía.

I. (1890- 1930) .Ver tabla de sinónimos.

II. (1936-1957). Kluver y Van Niel (1936); Stainer (1943); Sniezsko (1957).

III. 1967-1974. Schubert (1967, 1969, 1974).

IV. (1976-2005). Popoff y Verón (1976); Popoff y colaboradores (1981), Allen y col (1983 b); Popoff (1984). Colwell y col (1986); Hickmann-Brenner y cols (1987, 1988); Schubert y Hegazi (1988); Austin y col (1989); Schubert y col (1990 a y b); Carnahan y col (1991 a y b); Martínez-Murcia y col. (1992a). Esteve y col (1995 a, b); Ali y col (1996); Huys y col (1997); Pavan y cols (2000); Huys y col (2002a; 2003); Pidiyar y col (2002); Harf-Monteil y col (2004); Miñana-Galbis y col (2004).

<sup>2</sup>. Posteriormente *Vibrio proteolyticus*.

La octava edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Schubert, 1974) reconocía tres especies dentro del género *Aeromonas*: *A. hydrophila* (especie tipo), *A. punctata*, y *A. salmonicida*, cada una de ellas con varias subespecies. *A. hydrophila* subespecie proteolítica (Schubert, 1974) fue posterior y definitivamente incluida en el género *Vibrio* con el nombre de *V. proteolyticus*. (Bauman y cols, 1984). (Tabla nº 2)

Los resultados obtenidos por Popoff y Verón (1976) en un amplio estudio mediante taxonomía numérica, llevaron a estos investigadores modificar la composición en especies del género *Aeromonas*. Esta propuesta fue recogida por la primera edición del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Popoff, 1984) y supuso la inclusión de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* y *A. salmonicida*, esta última con varias subespecies en el género *Aeromonas*. (Tabla nº2)

Además, la primera edición de "Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology" situaba al género *Aeromonas*, junto con los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, y *Plesiomonas* en la misma Familia, *Vibrionaceae* (Baumann y Schubert, 1984).

En los últimos años, la relación entre *Aeromonas* y los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*, ha sido revisada en base a los datos aportados por diferentes estudios filogenéticos. Así los trabajos de Colwell y col, (1986) basados en estudios de hibridación RNA-DNA y secuenciación del gen RNAr 5s revelaron que las especies asignadas al género *Aeromonas* forman una rama filogenética distinta de las familias **Enterobactereaceae** y **Vibrionaceae**. Por ello estos autores propusieron la exclusión del género *Aeromonas* de **Vibrionaceae** y elevarlo al rango de familia *Aeromonadaceae*.

Los resultados obtenidos por Martínez-Murcia y cols en sus estudios de secuenciación de los genes de RNA ribosómico 16S (rDNA 16S) y del gen de la DNA girasa B (*gyrB*) concuerdan con los previamente presentados por Colwell y cols (1986), por tanto confirman y apoyan la propuesta de la Familia *Aeromonadaceae*.

En los últimos años, el número de especies incluidas en el género *Aeromonas* se ha incrementado notablemente, ya que con posterioridad a la primera Edición del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(1984) han sido descritas un total de 19 especies y 10 subespecies. (Tabla nº2).

Recientemente alguna de estas especies han sido propuestas como sinonimias unas de otras (Tabla nº1) según datos filogenéticos (Collins y cols 1991), aunque los resultados obtenidos por hibridación DNA-DNA son en algunos casos contradictorios (Huys y cols 2001; Esteve y cols 2003).

## **2. Grupos de hibridación y filogenia**

Los primeros experimentos de hibridación DNA-DNA en *Aeromonas* fueron realizados por Mac-Innes y cols (1979) dando como resultado que el género contenía dos grupos principales, uno heterogéneo conformado por las especies de *Aeromonas* móviles y otro constituido por las cepas inmóviles, más homogéneas que se corresponden con el grupo de *Aeromonas salmonicida*. Este trabajo impidió que se transfiriese las cepas no móviles de *A.salmonicida*, a un nuevo género (*Necromonas*), pues sugirió una relación muy estrecha entre las dos líneas evolutivas antes mencionadas.

Esta diversidad genética dentro de las especies móviles fue destacada además por Popoff y colaboradores (1981), quienes manteniendo las propuestas taxonómicas para las diferentes especies de su anterior trabajo (Popoff y Verón 1976) comprobaron que los grupos genéticos no aportaban diferencias fenotípicas.

Fanning y colaboradores en 1985, utilizando el método de la hidroxiapatita para la hibridación DNA-DNA a 60°C, presentaron resultados similares y apoyaron estas observaciones pues mantuvieron, de forma general, los grupos de hibridación propuestos por Popoff y cols en 1981. Estos autores, encontraron además que las *Aeromonas* móviles podían dividirse hasta en 10 diferentes grupos de hibridación (DHG1-DHG 10), (Farmer y cols. 1992) ya que incluyeron nuevas cepas de *Aeromonas* no estudiadas por Popoff y cols (1981). (Tabla nº3.)

Por otra parte estos autores propusieron una nueva especie para el DHG 10, el cual incluía cepas de *Aeromonas* ornitina descarboxilasa positivas, las cuáles previamente se habían denominado Grupo Entérico 77. Esta propuesta fue publicada en 1987 (Hickmann Brenner y cols 1987) como *A.veroni*, y además incluía en el estudio dos cepas de *Aeromonas* también ornitina positivas, pero genéticamente distintas a *A.veronii* las cuales fueron clasificadas como *Aeromonas* DHG 11. (Tabla nº3)

Lo más interesante es que estos autores sitúan en un *Addendum* del artículo publicado (Hickman-Brenner y cols 1987) que la cepa tipo de *A.veronii* (ATCC 35624<sup>T</sup>) estaba altamente relacionada por hibridación DNA-DNA con otras cepas de referencia de *Aeromonas* del grupo de hibridación DHG 8 las cuáles eran ODC negativas y fenotípicamente similares a *A.sobria*.

La revelación de que los DHG 8 y DHG 10 representaban en realidad un mismo grupo genómico introdujo un nuevo factor de complejidad en la taxonomía del género. Es decir, no sólo cepas fenotípicamente relacionadas pertenecían a diferentes grupos genómicos (Popoff y cols 1981), sino que lo contrario, es decir, que un mismo grupo genómico incluyera cepas muy diferentes a nivel fenotípico también era posible (Hickmann-Brenner y cols 1987). Esta aparente incoherencia entre fenotipo y genotipo originó que los términos fenospecie y genospecie se usaran como categorías independientes en la clasificación de las cepas de *Aeromonas* móviles



**Tabla nº 3.** Genospecies y fenospecies existentes dentro del género***Aeromonas*.**

DNA HGs	Cepa representativa	Genospecie	Fenospecie	Ref.
(212)	ATCC 7966 <sup>T</sup>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1
(218)	ATCC 14715	No nombrada	<i>A. hydrophila</i> .( <i>A. bestiarum</i> )	
(316)	ATCC 33685 <sup>T</sup>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> <sup>a</sup>	2-3
3	CDC 0434-84	No nombrada	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>	
4. (545)	ATCC 15468 <sup>T</sup>	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	4
5A (239)	CDC 0862-83	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	
5B	CDC 0435-84	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>	6-7
6 (546)	ATCC 23309 <sup>T</sup>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>	8
7 (208)	CIP 7433 <sup>T</sup>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	
8X (224)	CDC 0437-84	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> “biogrupo sobria”	9
8Y	ATCC 9071	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> “biogrupo sobria <sup>c</sup> ”	
9	ATCC 49568 <sup>T</sup>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	
10	ATCC 35624 <sup>T</sup>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	9
11	ATCC 35941	<i>A. sp.</i>	<i>Aeromonas. sp. (ornitina +)</i>	
12	ATCC 43700 <sup>T</sup>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>	
13	ATCC 43946	<i>A. sp.</i>	<i>Aeromonas grupo 501</i>	
14	ATCC 49657 <sup>T</sup>	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	
15	CECT 4199 <sup>T</sup>	<i>A. allosacharophila</i>	<i>A. allosacharophila</i>	
16	CECT 4342 <sup>T</sup>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>	
17	CECT 4995 <sup>T-</sup>	<i>A. popoffi</i>	<i>A. popoffi</i>	
		<i>A. enteropelogenes</i>	<i>A. enteropelógenes</i>	
		<i>A. ichthiosmia.</i>	<i>A. ichthiosmia</i> <sup>c</sup>	
18	NCIMB 5147 <sup>T</sup>	<i>A. culicicola</i>	<i>A. culicicola</i>	
19	CIP 107798 <sup>T</sup>	<i>A. simiae</i>	<i>A. simiae</i>	
20	CECT 58648 <sup>T</sup>	<i>A. molluscorum</i>	<i>A. molluscorum</i>	

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; CDC, Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, Ga.; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; CIP, Collection bactérienne de l’Institut Pasteur, Paris, France; NCIM, National Collection of Industrial Microorganisms, Pune, India.

<sup>a</sup> Incluyen las cepas no móviles, y psychrophilicas.

<sup>b</sup> Incluyen las cepas móviles, mesophilicas.

<sup>c</sup> *A. ichthiosmia* aparece como sinónimo de *A. veronii* biotipo *sobria* en referencias 106,108,109,138.

Carnahan and Altwegg (1996) “The genus *Aeromonas*”. Capitulo 1

(“Las denominaciones entre comillas fueron propuestas por Altwegg y cols (1990) y actualmente no están autorizadas por el IJSB. (Ref). Referencias enumeradas:

En Schubert (1974) corresponde a *A. hydrophila* subsp *hydrophila*<sup>T</sup>.

En Popoff y col (1981) uno de los grupos de hibridación incluido en *A. hydrophila*. la cepa Popoff 316 había sido clasificada originalmente como *A. dourgesi* var. *anaerogenes*.

Según Fanning y cols. (1985) la cepa tipo de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* pertenece a este grupo de hibridación.

En Schubert (1974) corresponde a *A. punctata* subsp. *caviae*.

En Schubert (1974) corresponde a *A. hydrophila* subsp. *anaerógenes*.

En Popoff y cols.(1981) un sólo grupo de hibridación que entre otras incluía cepas originalmente clasificadas como *A.dourgesi* var. *anaerógenes*.  
Según Fanning y cols (1985) este equivale a dos grupos de hibridación y ambos corresponden a la especie *A.media* descrita por Allen y col. (1983b)  
En Popoff y cols. (1981) este grupo de hibridación pertenece a la especie *A.caviae*. en Schubert (1974) la cepa Popoff 546 corresponde a *A.punctata* subsp *punctata*. Schubert y Hegazi (1988) describieron la especie *A.eucrenophila* con esta cepa.  
En Popoff y cols (1981) este grupo de hibridación pertenece a la especie *A.sobria*. La especie *A.veronii* se describe por Hickmann-Brenner y cols (1987) perteneciente al grupo de hibridación 10 de Fanning y cols (1985). Posteriormente se comprueba que los grupos 8 y 10 son idénticos. (Kuijper y cols., 1989). DNA HG8X Cepa de referencia usada por Popoff, cepa tipo de *A.sobria* (CIP 7433T) y que actualmente define al grupo HG8. DNA HG8Y. Cepa de referencia (ATCC 9071), representa cepas de *A.sobria* en su mayoría clínicas.

Este hecho también estuvo propiciado por los criterios taxonómicos asumidos por la comunidad científica para la descripción de las especies bacterianas. (Wayne y col 1987.)

Así, en el artículo de Wayne y cols (1987), la definición filogenética de especie estaba fundamentada en los niveles de homología DNA-DNA, de forma que la especie bacteriana estaría constituida por cepas con un nivel de homología DNA-DNA igual o superior al 70% y una  $\Delta T_m$  del DNA híbrido igual o inferior a los 5°C (=genospecie.). No obstante, Wayne y cols (1987) también resaltaron la importancia de las características fenotípicas, de forma que literalmente se recomendaba que “cuando una genospecie no pudiera ser diferenciada de otras genospecies en base a propiedades fenotípicas conocidas, no fueran propuesta como especie nueva hasta que pudiera diferenciarse a nivel fenotípico”.

Aunque desde 1977 las técnicas de medición de distancias evolutivas basadas en la secuenciación de genes de RNA ribosómico (5S, 16S) habían sido utilizadas para determinar relaciones filogenéticas a nivel supra específico (Woese, 1977; Woese 1987; Woese y cols 1983; Colwell y cols 1986), esta metodología no fue aplicada en el estudio de las relaciones inter-e intra específicas hasta comienzos de los años 90 (Ruimy y cols 1994;

Dorsch y cols 1992; Collins y cols 1991; Pitulle y cols 1992; Martínez-Murcia y cols 1992b; Collins y cols 1993). Así Martínez-Murcia y cols publicaron en 1992b el primer estudio filogenético basado en la secuencia del DNAr 16S, de los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Este estudio, además de suponer un hito en la taxonomía del género *Aeromonas*, participó plenamente de la controversia del momento sobre cuál era la relación existente entre el parámetro usado hasta ese momento para la definición filogenética de especie (Wayne y cols 1987), y los numerosos datos aportados mediante la técnica de secuenciación del DNAr 16S (Fox y cols 1992). A este respecto, el trabajo de Martínez-Murcia y cols. (1992b), puso de manifiesto el alto nivel de similitud 98-100% en la secuencia del DNAr 16S, existente entre distintas especies de *Aeromonas*, alertando de una posible falta de congruencia entre los resultados procedentes de la secuenciación del DNAr y aquellos derivados de la hibridación DNA-DNA.

Seguidamente, puesto que especies de *Aeromonas* “bona fide” (Wayne y cols, 1987) presentaban tan alta homología en la secuencia del gen DNAr 16S y se encontraban a escasa distancia evolutiva, propusieron la especie *A.allosaccharophila* para aglutinar cepas de *Aeromonas* que constituían un grupo fenotípico distinto además de una línea genética nueva dentro del género, según el análisis de la secuencia del gen DNAr 16S (Martínez-Murcia y cols 1992a). Este posicionamiento a favor de los resultados obtenidos en el análisis de la secuencia del gen 16S RNAr frente a aquellos derivados de la hibridación DNA-DNA, como parámetro filogenético para la definición de especie, fue fruto de su época, y su origen, en cierto modo, aún todavía sigue vigente ya que la metodología de la hibridación DNA-DNA es muy tediosa y complicada en comparación con las técnicas moleculares desarrolladas en los últimos tiempos. A mediados

de los años 90, la interrelación existente entre la homología DNA-DNA y el análisis de la secuencia del DNAr 16s, en cuanto a la definición filogenética de especie bacteriana, quedó establecida en la propuesta Stackebrandt y Goebel (1994), la cuál fue posible por la cantidad de especies bacterianas cuyo DNAr 16s había sido ya secuenciado.

Estos autores destacaron, tras un estudio comparativo entre ambos parámetros genéticos, las limitaciones de la secuencia del DNAr 16s frente a la cuál, el método de hibridación DNA-DNA y sus resultados eran superiores como parámetro para la definición filogenética de especie. No obstante destacaron la validez de la secuenciación del gen DNAr 16s para diagnosticar una baja relación filogenética entre cepas pertenecientes a especies distintas: “Organismos que presentan menos del 97% de homología en la secuencia del DNAr 16s no muestran más del 60% de homología DNA-DNA, por lo tanto no es necesario, en estos casos, aplicar el método de hibridación DNA-DNA”. (Stackebrandt y Goebel (1994). Finalmente, la propuesta de Stackebrandt y Goebel (1994) destaca nuevamente la importancia del fenotipo en la descripción de las especies bacterianas. Así, todas las descripciones de nuevas especies de *Aeromonas* que se publicaron a partir de los años 90, o bien incluyeron la secuencia del gen DNAr 16s o bien éstas fueron publicadas poco después, y por supuesto, en todos los casos se aportaron datos de homología DNA-DNA. Martínez-Murcia y cols 1992 a, b; Ali y cols 1996, Huys y cols 1997; Martínez-Murcia, 1999; Esteve y cols 1995 a, b; Carnahan y cols 1991; Schubert y cols 1990 a, b; Collins y cols 1993; Pavan y cols (2000); Huys y cols (2002a; 2003); Pidiyar y cols (2002); Harf-Monteil y cols (2004); Miñana-Galbis y cols (2004).

En esta época también se efectúa un esfuerzo notable, por parte de los autores, en la búsqueda mediante estudios numéricos (Taxonomía Numérica) de caracteres fenotípicos que sustenten los grupos genómicos existentes en el género (Kämpfer y Altwegg 1992, Austin y cols 1989; Esteve 1995; Carnahan y Joseph 1993; Noterdame y cols 1996; Kaznoswski y cols 1998) y con ello, puede considerarse superada la nomenclatura “fenospecie *versus* genospecie” tan utilizada durante la década de los 80. (Tabla nº3.)

A finales de los años los años 90, Huys y cols (1996) publicaron un trabajo donde mediante una nueva técnica molecular, el análisis de AFLP (“Amplified-Fragment Length Polymorphism”) aspiraban a discriminar los grupos de hibridación, es decir, las especies de *Aeromonas* descritas hasta la fecha. Este nuevo intento de validar un método molecular frente a la metodología clásica de hibridación DNA-DNA como parámetro genético para la definición del nivel de especie, introdujo grandes controversias en la taxonomía del género *Aeromonas*. (Esteve, 1997). Entre otras, los resultados basados en el análisis AFLP para las especies *A.allosaccharophila* y *A.enceleia* (Huys y cols 1996) eran contradictorios con otros previamente publicados, los cuáles estaban basados en el método de hibridación DNA-DNA (Esteve y cols 1995 a, b) y en la secuenciación del gen 16S RNAr. (Martinez-Murcia y cols 1992 a; Martinez-Murcia, 1999).

Finalmente la propuesta de Huys y col (1997 a) de enmendar la descripción de la especie *A.enceleia* (Esteve y cols 1995 b) fué aceptada, a pesar de que los datos aportados en el análisis AFLP y los nuevos datos de hibridación DNA-DNA eran totalmente contrapuestos a los publicados por otros autores (Esteve y cols 1995 b; Martínez-Murcia 1999). Aún hoy en día sigue abierta esta polémica, la cuál está siendo abordada a partir de la

secuenciación de otros genes esenciales tales como *gyrB* y *rpoD* (Soler y cols, 2004; Yañez y cols 2003).

Recientemente Stackebrandt y cols (2002) propusieron una re-evaluación de los criterios taxonómicos para la descripción de las especies bacterianas, en las que se recogen y valoran las herramientas taxonómicas empleadas en los últimos quince años. En esta propuesta el Comité (Stackebrandt y cols 2002) reitera la validez del criterio filogenético para la definición de especie basado en el método de hibridación DNA-DNA (Wayne y cols 1987), y ajusta a este “gold standard” cuál sea la significancia de otros métodos tales como la secuenciación de genes esenciales (16S *RNAr*, *Gyr B*, *rpoD*, etc.) o el ribotipado (AFLP, PCR-RFLP, 16S RNA RFLP, etc.). Ante esta propuesta, en los años recientes hemos observado la introducción de nuevas metodologías para la hibridación DNA-DNA, tales como las realizadas en microplaca (Goris y cols 1998; Kaznowski, 1995; Christensen y cols 2000), y así la mayoría de los nuevos taxones descritos en el género *Aeromonas* han sido fundamentados en datos de homología DNA-DNA obtenidos mediante esta nueva metodología (Huys y cols 1997 a, b; Huys y cols 2001; Huys y cols 2002 a, b; Vyankatesh y cols 2002; Huys y cols 2003; Miñana-Galbis y cols 2004). No obstante en la actualidad asistimos a la existencia de claras discrepancias entre datos de homología DNA-DNA obtenidos mediante métodos clásicos (Schubert y cols 1990 a, b; Esteve y cols 1995 a, b; Esteve y cols 2003) y algunos métodos de hibridación en microplaca (Huys y cols 1997 a, b; Huys y cols 2001, 2002 b), lo cuál concierne al estatus taxonómico de las especies *A.encheleia*, *A.allosaccharophila*, *A. enteropelogenes* y *A.ichtiosmia*. (Tabla nº4).

**Tabla n°4.** Niveles de homología DNA-DNA reportados en la bibliografía para las diferentes especies, cepas tipo y referencia\* de *Aeromonas*.

Especies	<i>A. hydrophila</i>			<i>A. salmonicida</i>																									
	<i>hydrophila</i>	<i>dhakensis</i>	<i>ranae</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>	<i>salmonicida</i>	<i>smithia</i>	<i>pectinolitica</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii bio sobria</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii bio veronii</i>	<i>Aeromonas sp (enteric 77)</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>Aeromonas sp 501</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. encheleta</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. enteropelogenes</i>	<i>A. ichtiosmia</i>	<i>A. culicicola</i>	<i>A. simiae</i>	<i>A. molluscorum</i>	
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
DHG's	1	2			3	4				5B	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17							
1	100 100 100	78 78	93	78, 65*	14,1	18,9	12,4	17,6 37-63	15,1	46 21*	42,3	41 65 22,3	25,1 75		51	57 65		34 20*		35	ND 65	41 27	50	43 -51	42- 51	61		28	
2	82	100 100	84																	37									
3	83	76	100																		0								
4		33- 65	49- 64	100 100*							51									30	0		53					34	
5								44	74,3		53									27									
6								76	75,1																				
7	75,9	33-65	49-64	71 62*	73,8	77,2	100	74,3	76,7		18,3	20,5	30,7 72		47	55		32					45-49	39				37	
8								100	73,2																				
9	15,9				74,3	75,1	76,1	73,2	100		17,8	28,3	34,8																
10		33-65	49-64	34 33*				45- 47		100 100	44 53				39	45 59		26			62	36 29	39		60			39	
11		33-65						5	17,8	60 29*	57		21	40	47		33			33	35		37					45	
12		33-65							28,3		76-100			47	66 56*					32	22	7	42					40	
13		33-65	49- 64					71- 72	34,8	41 17*	33			53 32*			27 14*		32	0	37 48	40	47	62	67		27		

Tabla nº4. (Cont).

Especies	<i>A. hydrophila</i>			<i>A. salmonicida</i>					<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. eurenophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii bio sobria</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii bio veronii</i>	<i>Aeromonas sp (enteric 77)</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>Aeromonas sp 501</i>	<i>A. trola</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. enteropelogenes</i>	<i>A. ichtiosmia</i>	<i>A. culicicola</i>	<i>A. simiae</i>	<i>A. molluscorum</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8																				9
Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
DHG's	1			2	3					4	5B	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
14				42 34*											72 46*					36	0	40				74	32	
15	33-65														100					35	0	0	22				82	
16	33-65									52					58 40*	100	39			41	0	19	45	49	60	79	35	
17															49 26*		30			32	0	12	60				40	
18	33-65														35			100		17	0	0	39			16	28	
19																		70		16	0	3					29	
20	33-65																			100*	0	0	44			18	38	
21										50					78-80						100	0	36		78		38	
22	33-65										45-52										86-100	0	36		78		38	
23	33-65		49-64																			70- 100	47				44	
24																						82- 105	100				85	
25										54					96						85				100		30	
26																									100		89- 100	
27																											93, 100	
28																											93, 100	

a) Metodología: Nucleasa S1 de Crosa y cols., 1973. [Nucleasa S1]. (\*) 85°C. Ref. (Popoff y Verón, 1976; Popoff y cols, 1981; Hickman-Brener y cols, 1987; Hickman-Brener y cols, 1988)

b) Metodología: renaturalización óptica de De Ley y cols., 1970: Ref. (Popoff y col, 1976; Allen y cols, 1983; Austin y col, 1989; Schubert y col, 1988; Schubert y Hegazi, 1990 ayb;Huys y col, 1997a,b)

c) Método de Jonson (1994). Hibridación competitiva en filtro de nitrocelulosa (Johnson 1994), Marcador [3H]dCTP, Temperatura: 55,5-56°C. Ref. (Carnahan y col, 1991, Esteve y col, 1995b,c; Pavan y cols, 2000)

g) Metodología. Fluorométrico por Microplacas (Ezaki y cols, 1989) modificado por Goris y cols (1998). Temperatura 45°C. ) Ref. (Huys y cols, 2001, 2002\*, 2003 y 2005; Miñana-Galbis y cols.2004)

d) Metodo de hidroxiapatita para análisis de hibridación, marcaje con 32P.(60°C); (\*75°C). Ref. (Carnahan y cols, 1991; Ali y cols, 1996)

e) Metodología Hibridación DNA-DNA (Riegel y cols, 1994) 60°C. Método nucleasa- tricloroacético. Ref. (Harf-Monteil y cols, 2004)



### 3. Estructura taxonómica del género *Aeromonas* en la actualidad.

#### 3.1. Familia *Aeromonadaceae* (Género *Aeromonas*). Caracteres generales.

Colwell y cols (1986) aportan en su descripción de la Familia *Aeromonadaceae* los siguientes caracteres:

- Bacilos rectos o curvos, Gram negativos: Móviles mediante flagelo polar. No forman microcistes ó endosporas.
- Quimiorganotrófos y anaerobios facultativos capaces de desarrollar metabolismo oxidativo o fermentativo. El oxígeno es el aceptor universal de electrones. Reducen los nitratos a nitritos pero no desnitrifican. La mayoría son oxidasa positiva, utilizan D-glucosa como única fuente de carbono y energía (principalmente) y sales amoniacales como fuente de nitrógeno. Unos pocos requieren factores de crecimiento relativamente sencillos.
- Pueden ser psicrófilos ó mesófilos y también móviles ó inmóviles. Algunas especies son patógenas para el ser humano, anguilas, batracios y para otros vertebrados e invertebrados además.
- Aparecen ampliamente distribuidos, en ecosistemas acuáticos, aguas dulces o asociadas a animales, podemos encontrarlas, también en las aguas residuales.
- Contenido de G-C entre un 40-63%.

**Género tipo:** *Aeromonas* 398<sup>T</sup>. (Kluyver & Van Niel, 1986).  
Ae.ro.mo'nas. Gr.n.aer, aire, gas; Gr.n monas, unidad, monad; ML.fem.n.  
Aeromonas: "Unidad productora de gas".

La referencia de esta descripción es la cita en la Primera edición del Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (Popoff, 1984), y que aporta los siguientes caracteres adicionales:

- Los cultivos jóvenes pueden sintetizar flagelos peritricos en medios sólidos.
- La fermentación de carbohidratos rinde como productos finales, ácidos ó ácidos y gas. (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>).
- Temperatura óptima de crecimiento, entre 22-28°C, algunas cepas no crecen a 35°C.
- Resistentes al agente vibriostático O/129.
- Porcentaje de G-C de sus DNA entre 57-63%.
- Especie tipo: *Aeromonas hydrophila* 213(Chester, 1901; Stainer 1943).

Según el Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (9ª Edición) el género *Aeromonas* puede ser diferenciado de otros géneros relacionados mediante los caracteres que se detallan en la Tabla nº5.

**Tabla nº5. Vibrionaceae<sup>a</sup>.** (Según "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9ª Edición).

Características	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Erhymbacter</i>
Flagelo polar envainado	+	-	-	-	-
Movilidad	+	+	[+] <sup>c</sup>	+	-
Acumulación de poli-β-hydroxibutirato asociado a la incapacidad de utilizarlo	-	+			
Requiere Na <sup>+</sup> como factor de crecimiento	+	+	-	-	-
Lipasa	[+] <sup>b</sup>	D	[+]	-	+
Utilización de D-manitol	[+] <sup>c</sup>	-	[+]	-	-
Sensibilidad al agente vibriostático O/129 <sup>d</sup>	+	+	-	+	-
% Mol de G+C en DNA	38-51	40-44	57-63	51	66

<sup>a</sup>. Símbolos: +, todas las especies dan un resultado positivo, [+], muchas especies positivas; -, todas las especies negativas; D, algunas especies positivas; algunas negativas.

<sup>b</sup>. *V.nereis*, *V.anguillarum* biovar II, y *V.costicola* son negativos.

<sup>c</sup>. *V.nereis*, *V.anguillarum* biovar II y *V.marinus* son negativos.

<sup>d</sup>. Algunas excepciones.

<sup>e</sup>. Excepto *A.media* y *A.salmonicida*.

### 3.2. Especies del género *Aeromonas*.

Las bacterias del género *Aeromonas* producen en medios sólidos colonias convexas de bordes irregulares, bien irregulares, bien opacas o translúcidas. Mayoritariamente las especies de *Aeromonas* producen ácido y gas en la fermentación de glucosa, sólo son aerogénicas *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas schubertii*, *A.simiae*, *A.molluscorum* y *A.salmonicida* (*subespecie smithia*). (Tabla nº6).

Otras características que son generalmenete positivas para las especies de *Aeromonas* son la de presentar en el sistema arginina dihidrolasa (ADH+), la capacidad de producir indol a partir de triptófano (Indol +), y la producción de ácido a partir de D-manitol (Manitol+). (Tabla nº6).

No obstante algunas pocas especies no presentan estas características. Así, las especies es que *Aeromonas veronii bio veronii* y *A.salmonicida* (*subsp. smithia* y *peptinolítica*) carecen de respuesta arginina dihidrolasa (Tabla nº6); las especies *Aeromonas schubertii*, *A.simiae*, *A.molluscorum* y *A.salmonicida* (*subsp. smithia* y *peptinolítica*) son indol negativas y por último las especies *Aeromonas schubertii*, *A.simiae*, y *A.salmonicida* (*subsp. acromógenes* y *smithia*) son incapaces de producir ácido a partir de D-manitol (Tabla nº6). Entre los caracteres generalmente negativos para la especie de *Aeromonas* cabe destacar, por su valor diagnóstico, el test para la ornitina descarboxilasa (ODC). Así, aunque las especies de *Aeromonas* no suelen presentar sistema Ornitina descarboxilasa, la excepción la encontramos en los taxones *A. veronii bio veronii* y *A.allosacharophila*, pues ambas incluyen cepas ODC positivas. (Tabla nº6).

En general, las especies de *Aeromonas* son sensibles a tetraciclina, cloranfenicol, sulfamidas potenciadas, gentamicina, ampicacina,

nitrofurantína, tobramicina y cefalosporinas de tercera generación, mientras que son resistentes a penicilina, ampicilina, carbenicilina, eritromicina y vancomicina. (Altwegg, 1999) No obstante, las especies *Aeromonas trota*, y *Aeromonas salmonicida* (subsp. *smithia*) son sensibles a la ampicilina. (Tabla nº6).

Finalmente cabe destacar que muchas especies de *Aeromonas* han sido aisladas de muestras clínicas y/o de animales enfermos. Así las especies con incidencia clínica son *Aeromonas hydrophila*, *A.caviae*, *A.veronii* (biogrupos *sobria* y *veronii*), *A.schubertii*, *A.allosacharophila*, *A.jandaei*, *A.trota*, *A.ichtiosmia*, y *A. enteropelogenes*. (Esteve y cols.1993; Munro y cols, 1993; Roberts y cols, 1993). Por otra parte las especies de *Aeromonas* implicadas en zoonosis son *A.hydrophila*, *A.jandaei*, *A.sobria*, *A.caviae* y *A.salmonicida* (subsp *salmonicida*, *masoucida* y *smithia*). (Esteve y cols.1993; Munro y cols, 1993; Roberts y cols, 1993).

En la actualidad el género *Aeromonas* incluye 19 especies: *Aeromonas hydrophila*, con las subespecies *hydrophila*, *dhakensis* y *ranae*; *Aeromonas bestiarum*; *Aeromonas salmonicida* con las subespecies *salmonicida*, *achromógenes*, *masoucida*, *smithia* y *pectinolytica*; *Aeromonas caviae*; *Aeromonas media*; *Aeromonas eucrenophila*; *Aeromonas sobria*; *Aeromonas jandaei*; *Aeromonas veronii*; *Aeromonas schubertii*; *Aeromonas trota*; *Aeromonas allosaccharophila*; *Aeromonas enteropelogenes*; *Aeromonas ichtiosmia*, *Aeromonas encheleia*; *Aeromonas popoffii*, *A.culicicola*; *A.simiae* y *A.molluscorum*. (Tabla nº6).

**Tabla n°6.** Características fenotípicas diferenciales descritas para *Aeromonas* por sus autores.

Cepas	<i>A. hydrophila</i> subespecie			<i>A. salmonicida</i> subespecies							<i>A. veronii</i> biogrupos																
	<i>hydrophila</i> <sup>e</sup>	<i>dhakensis</i> <sup>o</sup>	<i>ranae</i> <sup>p</sup>	<i>achromogenes</i> <sup>e,k</sup>	<i>masoucida</i> <sup>e,k</sup>	<i>salmonicida</i> <sup>u,k</sup>	<i>smithia</i> <sup>k</sup>	<i>pectinolitica</i> <sup>k</sup>	<i>A. bestiarum</i> <sup>l</sup>	<i>A. caviae</i> <sup>g</sup>	<i>A. media</i> <sup>d</sup>	<i>A. eucrenophila</i> <sup>b</sup>	<i>A. sobria</i> <sup>a</sup>	<i>A. jandaet</i> <sup>d</sup>	<i>veronii</i> <sup>b</sup>	<i>sobria</i> <sup>b</sup>	<i>A. schubertii</i> <sup>c</sup>	<i>A. troida</i> <sup>d</sup>	<i>A. allosachphila</i>	<i>A. encheleid</i> <sup>b</sup>	<i>A. popoffii</i> <sup>r</sup>	<i>A. enteropelógenes</i> <sup>m,h</sup>	<i>A. ichitiosmia</i> <sup>m,h</sup>	<i>A. cutlicicola</i> <sup>e</sup>	<i>A. simiae</i> <sup>g</sup>	<i>A. molluscorum</i> <sup>r</sup>	
Movilidad	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento marrón	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	
Gas de glucosa	+	+	NR	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	V <sup>d</sup>	-	+	+	+	+	+	+	NR	-	-	
glicerol	36	NR	NR	v	v	V	NR	NR	NR	-	NR	-	+	NR	NR	NR	-	NR	NR	v-	+	NR	NR	NR	NR	NR	
Voges Proskauer	+	+	42	-	+	-	-	+	+	-	-	v	+	+	+	*	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	
Indol	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	75	+	+	+	-	-	
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
LDC	+	+	+	v	V	v <sup>j</sup>	-	-	+	v <sup>d</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	v	-	+	+	-	
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v <sup>i</sup>	-	-	-	-	-	-	-	
Crecimiento a 42°C	+	+	NR	-	-	-	-	NR	NR	v	-	-	v	+	+	+	+	+	+	-	NR	NR	+	NR	+	-	
Actividad Elastasa	+	NR	+	NR	NR	j	-	-	78	-	-	+	-	-	v <sup>d</sup>	-	+	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	-	
Hidrólisis Esculina	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	v	+	
Arbutina	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	+	-	+	v	-	v	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
SDS	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	63	+	-	NR	NR	-	-	NR	NR	-	NR	NR	NR	
Fermentación/Acido																											
L-Sorbitol	-	NR	-	-	-	-	17	+	-	v	-	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-Arabinosa	V <sup>+</sup>	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	V	-	NR	-	-	-	-	-	+	
D-Celobiosa	v-	-	-	-	-	-	-	+	11	V <sup>+</sup>	-	+	V	-	+	+	+	+	-	+	+	v	-	+	+	+	
D-Manitol	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NR	NR	+	+	+	
Sacarosa	+	+	-	+	+	-	V <sup>+</sup>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	75	-	+	+	+	+	+	+	
D-Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	NR	v	-	-	NR	NR	-	-	-		
L-Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	78	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	v	75	-	NR	NR	-	-	-		
D-Melibiosa	-	-	-	NR	NR	NR	NR	+	+	-	NR	+	-	-	-	-	NR	V	-	-	NR	NR	+	-	-		

Cepas	<i>A. hydrophila</i> subespecies			<i>A. salmonicida</i> subespecies										<i>A. veronii</i> biogrupos													
	<i>hydrophila</i> <sup>a</sup>	<i>dhakensis</i> <sup>o</sup>	<i>ranae</i> <sup>p</sup>	<i>achromogenes</i> <sup>q,k</sup>	<i>mausoidae</i> <sup>k</sup>	<i>salmonicida</i> <sup>u,k</sup>	<i>smithia</i> <sup>k</sup>	<i>pectinolitica</i> <sup>k</sup>	<i>A. bestiarum</i> <sup>l</sup>	<i>A. caviae</i> <sup>e</sup>	<i>A. media</i> <sup>f</sup>	<i>A. eucrenophilid</i> <sup>h</sup>	<i>A. sobrid</i> <sup>g</sup>	<i>A. jandae</i> <sup>d</sup>	<i>veronii</i> <sup>b</sup>	<i>sobrid</i> <sup>b</sup>	<i>A. schubertii</i> <sup>r</sup>	<i>A. trotta</i> <sup>f</sup>	<i>A. altosacharophila</i> <sup>e</sup>	<i>A. encheleida</i> <sup>h</sup>	<i>A. popoffii</i> <sup>t</sup>	<i>A. enteropelógenes</i> <sup>m,h</sup>	<i>A. ichtiosmida</i> <sup>h</sup>	<i>A. culicicola</i> <sup>p</sup>	<i>A. simiae</i> <sup>g</sup>	<i>A. molluscorum</i> <sup>f</sup>	
Salicina	79	+	-	v	v	v	-	-	89	+	+	‡	-	-	‡ <sup>d</sup>	- <sup>a</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+(80)
Utilización de:																											
Ac. urocánico	- <sup>j</sup>	-	+	+	+	+ <sup>i</sup>	+	+	+ <sup>i</sup>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	NR	NR	NR	
L-Histidina	+	+	+	-	-	-	-	NR	NR	+	V	+	-	- <sup>i</sup>	NR	NR	NR	NR	+	75	+	NR	NR	NR	NR	+	
L-Glicina	NR	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-‡	NR	-	NR	-	NR	NR	-	-	-	NR	-	NR	NR	NR	
L-Butirato	38	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	-	25	-	NR	NR	NR	NR	NR	
Fucosa	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	
DL aspartato	+	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	‡	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	V	NR	NR	NR	NR	NR	
DL-Lactato	+ <sup>j</sup>	+	+	-	-	- <sup>j</sup>	-	-	-	V <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	-‡	+	NR	-	NR	NR	NR	
L-Glutamina	V	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	‡	- <sup>i</sup>	+	NR	+	NR	+ <sup>i</sup>	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	
Acetato	V	+	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	v	V	89‡	V	NR	+	+	v	NR	NR	NR	-	NR	+	NR	NR	+	
Citrato	V	NR	NR	-	-	-	-	+	89	v	-	-	v <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+ <sup>i</sup>	-	v	NR	-	+	NR	+	
L-Glutamato	+	-	-	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	+	89‡	+	+	+	+	NR	NR	+	75	+	NR	+	NR	NR	NR	
L-Alanina	V	+	71	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	+	-‡	-	-	NR	-	NR	NR	-	-	87	NR	-	NR	NR	NR	
D-gluconato	+	+	+	NR	NR	NR	-	-	- <sup>i</sup>	+	+	89‡	+	+	+	+	+ <sup>i</sup>	-	+	-	+	-	+	NR	+	NR	
L-Arginina	74	+	+	-	-	-	-	NR	NR	+	+	+	-	-	-	+	+ <sup>i</sup>	+ <sup>i</sup>	+	-	v	NR	-	+	NR	+	
L-Prolina	-	+	+	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	+	89‡	-	+	+	+	NR	NR	+	+	-	NR	+	NR	NR	NR	
L-Arabinosa	+	-	-	-	+	+	-	+	NR	+	+	+ <sup>i</sup>	-	-	-	-	- <sup>i</sup>	- <sup>i</sup>	+	-	NR	NR	-	NR	-	+	
Oxidación de gluconato	+	+	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	NR	
Ampicilina	R	R	R	NR	NR	NR	S(83)	NR	NR	R	R	NR	NR	R	R	R	R	S	R	R	R	NR	NR	R <sup>i</sup>	R	R	

(+), ≥ 80% respuestas positivas; (-) ≤ 20% respuestas negativas; v, 21-79% respuestas positivas, (#) expresiones en porcentajes; (i) resultados obtenidos para la cepa tipo; NR, datos no reportados; R, resistente, S, sensible; Cl, clínico, A, ambiental. (\*) respuestas diferentes han sido reportadas (Schubert y cols, 1990b; Huys y cols., 1997, 2001). ‡ (Huys y cols, 1997b).

- a) Popoff y Verón (1976); Popoff (1984); Austin y cols (1989); Carnahan y Joseph (1993); Esteve (1993); Esteve y cols (1995).
- b) Hickman-Brenner y cols (1987); Carnahan y cols (1991); Esteve (1993); Esteve y cols (1995).
- c) Hickman-Brenner y cols (1980); Carnahan y Joseph (1993); Esteve (1993).
- d) Abbott y cols (1992); Carnahan y Joseph (1993).
- e) Carnahan y col (1991); Carnahan y Joseph (1993); Esteve (1993).
- f) Allen y cols (1983); Austin y cols (1989).
- g) Martínez-Murcia y cols (1992).
- h) Esteve y cols (1995).
- i) Resultados cepa tipo.
- j) Carnahan y cols (1996).
- k) Austin y cols ((1989); Pavan y cols (2000).
- l) Huys y col (1997).
- m) Schubert R.H.W, Hegazi y Wahling (1990).
- n) Schubert R.H.W, Hegazi y Wahling (1990).
- o) Huys y cols (2002).
- p) Huys y col, 2003
- q) Vyankatesh, P y cols (2002).
- r) Colette Harf-Monteil y cols. (2004).
- s) Miñana-Galbis y cols. (2004).



**3.2.1 *Aeromonas hydrophila*. subsp. *hydrophila*.** (Chester 1901), Stainer 1943. (“Approved lists 1980”) emend. Huys y cols, 2002.

[hy.dro'phi.la.GR.n hydro agua; Gr.adj philos amor, afinidad; M.L.adj. hydrophila, afin al agua].

El nombre *Aeromonas hydrophila*. subsp. *hydrophila* fue incluido en “The Approved Lists of Bacterial Names” (Skerman y cols 1980) pero posteriormente Popoff (1984), le asignó rango de especie como *Aeromonas hydrophila*.

Bacilos rectos, 0.3-1.0 µm de diámetro y 1.0-3.5µm de largo. Gram negativas. Móviles por flagelación polar en medio líquido; puede producir flagelación peritrica en medio sólido, en cultivos jóvenes. Flagelo no encapsulado.

Temperatura óptima de crecimiento, 28°C en TSA. Colonias color blanco cremoso, circulares y convexas con márgenes enteros. Las cepas producen indol, pueden usar L-histidina, L-arabinosa y L-arginina, como única fuente de carbono. Hidrolizan la esculina, crecen en medio KCN, fermentan salicina, sacarosa y manitol, producen gas y acetoina a partir de glucosa, y producen sulfhídrico de cysteína. No producen pigmento marrón difusible en el medio de cultivo, no hidrolizan el inositol.

Pueden ser patógenos para las ranas, los peces, y otros animales incluyendo el hombre. Se encuentran en aguas dulces y en aguas residuales. El contenido G+C del DNA oscila en el rango de 58-62 mol %.

Cepa tipo: ATCC 7966 (*CECT 839<sup>T</sup>*).

Muy recientemente (Huys y cols 2002) han propuesto enmendar la descripción original de *A.hydrophila* GH1 (= *A.hydrophila* subsp. *hydrophila*) aportando las siguientes características.



Pueden crecer también a 41°C después de las 24-48 hrs. Presentan lisina descarboxilasa. No producen triptófano desaminasa.

Utilizan como fuente de carbono y energía: N-acetil-β-D-galactosamina, L-alanina, *p*-arbutina, DL-lactato, D-manitol, putrescina, D-serina, salicina y sacarosa. No utilizan: D-celobiosa, DL-isocitrato, β-alanina, 4-aminobutirato, cis-aconitato, DL-aspartato, caprato ó ácido urocánico.

Producen ácido de L-arabinosa. No lo producen de D-celobiosa, lactosa o D-sorbitol. Alta actividad β hemolítica en agar TSA suplementado con 5% de sangre de carnero.

Posteriormente Huys y colaboradores (2002a; 2002b) describieron las subespecies *Aeromonas hydrophila subsp.dhakensis*: (LGM 19562<sup>T</sup> =CCUG 45377<sup>T</sup>) y *Aeromonas hydrophila subsp.ranae* .(LMG 19707<sup>T</sup> = CCUG 46211<sup>T</sup>).

En la Tabla 6 se detallan algunas pruebas diferenciales de cada una de las subespecies de *Aeromonas hydrophila*.

### **3.2.2. *Aeromonas bestiarum*.** (Ali y cols 1996).

[bes.ti.a'rum, derivado del nombre latín ó sustantivo, *bestiarum* que significa, proveniente de “bestia” (sea salvaje o doméstica) ]

Este taxón se denominó previamente como *Aeromonas hydrophila* HG 2 (Fanning y cols 1985), el cuál correspondía con el grupo de hibridación 218 definido por Popoff y col (1981).

En la descripción (Ali y cols 1996) se incluyen los siguientes caracteres fenotípicos: Móvil, produce indol de triptófano, acetoina y gas de glucosa y H<sub>2</sub>S de cisteína. Presenta arginina dihidrolasa y lisina descarboxilasa, pero no presenta ornitina descarboxilasa.

Utiliza citrato y ácido urocánico como fuente de carbono y energía, pero no usa ácido fenilpiruvico ni DL-lactato. Hidroliza esculina, gelatina y elastina (a 25°C).

Produce ácido de L-arabinosa, maltosa, sacarosa, trealosa, glicerol, manitol, manosa y salicina. No produce ácido de xilosa, lactosa, celobiosa, rafinosa, adonitol, dulcitol, inositol, sorbitol, melibiosa, ni de amigdalina.

Patógenos en principio de animales, sin excluir al hombre. Origen veterinario y medio ambiental.

**3.2.3. *A.salmonicida* subsp. *salmonicida*** (Lehman y Newmann 1896). Griffin y cols 1953.

[Sal.mon.ic'i.da.L.n.salmo, salmonis, salmón; L. suff.-cida. L.v. caedo asesino; M.L.n.*salmonicida*, asesina del salmón].

Cocobacilo; En preparaciones a partir de caldo nutriente pueden verse en parejas, cadenas o agrupaciones, en preparaciones microscópicas de contraste de fases, inmóviles.

Temperatura óptima de crecimiento, entre 22-25°C. Morfología colonial circular, colonias elevadas, translúcidas, y frágiles.

Las cepas de este subespecie producen en medios conteniendo tirosina ó fenilalanina al 0.1%, pigmento marrón difusible.

Características fisiológico-nutricionales positivas: oxidasa; reducción de nitratos a nitritos; arginina dihidrolasa de Möller's; hidrólisis de gelatina, almidón, DNA, RNA, TW80 y esculina; crecimiento en agua de peptona sin cloruro de sodio; fermentan maltosa, manitol, galactosa y trehalosa. Caracteres negativos: Producción de indol, ODC; triptófano y fenilalanina desaminasa; ureasa; citrato de Simmons y Christensen's;

fermentan celobiosa, lactosa, sorbitol, dulcitol, rhamnosa, inositol, xylosa, raffinosa y adonitol; no asimilan malonato, mucato y tartrato; y no presentan tetrionato reductasa.

Pueden encontrarse, como agentes patógenos en los salmones, causando furunculosis y en otros peces, causando infecciones serias en los mismos. No se encuentran en las aguas superficiales.

El %mol G+C oscila en el rango de 57-59

Cepa tipo: *NCMB 1102 (CECT 894<sup>T</sup>)*.

Posteriormente otros autores describieron nuevas subespecies de *Aeromonas salmonicida*:

*Aeromonas salmonicida* subsp.*achromogenes*. (Smith, 1963). Schubert 1967. [Cepa tipo: *NCMB 1110*].

*Aeromonas salmonicida* subsp.*masoucida*. (Kimura, 1969). Cepa tipo: *ATCC 27013*.

*Aeromonas salmonicida* subsp.*smithia*. (Austin, D.A, McIntosh y Austin B, 1989). Cepa tipo: *138 (Owen AS 20/7/1), CCM 4103*.

*Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica*. (Pavan. M.E y cols 2000). Cepa tipo *34mel<sup>T</sup> (DSM 12609<sup>T</sup>)*.

En la tabla nº6 se detallan algunas pruebas diferenciales de cada una de las subespecies de *Aeromonas salmonicida*.

*Aeromonas caviae* (ex Eddy 1962), Popoff 1984.

[Ca'vi.ae. M.L.fem.n *Cavia*, nombre genérico del cerdo de guinea;

M.L.gen.n. *caviae* del puerco de guinea].

Son positivas para movilidad (flagelación monotrica en medio liquido); crece en caldo nutritivo a 37°C; produce indol en agua de peptona al 1%; hidroliza la esculina; crece en caldo KCN; utiliza L-arabinosa, L-

histidina, L-arginina y salicina ; fermenta salicina, sacarosa y manitol. También son positivas para oxidasa; reducción de nitratos a nitritos; poseen arginina dihidrolasa, hidrolizan almidón, gelatina, DNA, RNA y Tween 80; crecen en agua de peptona sin NaCl, positivas para el test ONPG; fermentan maltosa, galactosa y threalosa; No producen gas ni acetoína de glucosa; ni cisteína sulfhídrico de triptofano o fenilalanina desaminasa. No presentan ornitina decarboxilasa, ni ureasa. Son incapaces de fermentar dulcitol, ramnosa, inositol, xilosa, rafinosa y adonitol. No hidrolizan malonato, mucato ni D-tartrato. No producen pigmento marrón difusible.

Se pueden encontrar en aguas dulces o aguas residuales, además de encontrarse en peces.

El contenido de G+C del DNA está en el rango de 61-63 mol%.

Cepa tipo: *ATCC 15468*.

### **3.2.5. *Aeromonas media*.** (Allen y cols 1893).

[me.´ di. a. f.L. adj. medius, en el medio]. Bacilos Gram negativos, con los extremos redondeados e inmóviles.

En TSA las colonias son color crema, enteras lisas con aproximadamente 2 mm de diámetro después de una incubación a 22°C durante dos días. Producen pigmento marrón difusible. Reducen los nitratos. El rango de temperatura de crecimiento es amplio, entre los 4-37°C, pero no crecen a 42°C.

Presentan arginina dihidrolasa, pero no lisina u ornitina descarboxilasas. Son hemolíticas, también lisan gelatina, almidón, ácido ribonucleico, Tween 20, 40, 60 y 80; pero no hidrolizan celulosa, elastina, lecitina, xantina ni urea. Produce  $\beta$ -galactosidasa pero no fosfatasa ni H<sub>2</sub>S. El test de rojo de metilo es positivo, pero no el tests Voges Proskauer ni la

oxidación del gluconato. Sensible a cloranfenicol, chlortetraciclina, sulfato de colistina, furazolidone, gentamicina, kanamicina, neomicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina y tetraciclina; pero es resistente a ampicilina, cloxacilina, novobiocina, penicilina G ó sulfafurazol. Utiliza como fuente de carbono y energía L-arabinosa, glicerol, manitol, L-prolina, L-serina, acetato, glutamato, piruvato y succinato. No utiliza adonitol, D(+) celobiosa, eritritol, etanol, D(-) fructosa, inositol, inulina, L-leucina, D(+) melicitosa, ácido p-hidroxibenzoico, D (+) raffinosa, benzoato, formato de sodio, malonato, D(-) sorbitol, sacarosa, D(+) trehalosa, L-valina, o D (+) xilosa.

Contenido en G+C del DNA es de  $62.3 \pm 0.2\text{mol}\%$ .

Cepa tipo: *R<sub>M</sub>*. (ATCC 33907).

**3.2.6. *Aeromonas eucrenophila*.** (Schubert y Hegazi, 1988) emend. Huys y cols. 1997

[eu. créno. phila Gr.fem.n; eu, good; krene well; Gr.adj. philos, loving; *eucrenophila*: adora el agua]

Células rectas, bacilares con bordes redondeados de 1.0-4.4µm, ocasionalmente forman filamentos de hasta 8µm de longitud. Móviles por presencia de flagelo polar, generalmente monotrico.

Los carbohidratos son degradados en ácido y gas (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>). No producen acetoína en la fermentación de glucosa. Crece en medios minerales con amonio como única fuente de nitrógeno y como única fuente de carbono puede utilizar: glucosa, arginina, asparagina o histidina.

Produce gas de glucosa, pero no de glicerol. Degrada fructosa, maltosa, trehalosa y esculina. No fermenta adonitol, dulcitol, inositol, inulina, melecitosa, sorbosa ni xilosa, pero si fermenta salicina. Hidroliza almidón, esculina, dextrina y DNA y además licuan la gelatina, pero no

degrada elastina. Producen arginina deshidrogenasa y fosfatasa. No glutamato descarboxilasa ni ureasa. No crecen a 40°C. La temperatura máxima de crecimiento es 37°C y la temperatura mínima está en el rango de 0-5°C. Crece en caldo KCN. Produce H<sub>2</sub>S de cisteína. Muchos tests bioquímicos, están establecidos a una temperatura óptima de crecimiento de 30°C, sin embargo algunos resultados han sido mejores a 20°C. El crecimiento se restringe a un pH entre 5.5-9.0. El % mol G+C del DNA entre 59.8-62.6.

Cepa tipo: *NCMB 74*.

Recientemente Huys y cols (1997) han propuesto enmendar la descripción de *A.eucrenophila*, incluyendo nuevos aislamientos procedentes de plantas potabilizadoras de agua. No obstante los datos de hibridación DNA-DNA presentados en la propuesta para las cepas BPE11, I/II y 23/II eran discordantes y opuestas a los previamente detallados en la descripción original de *A.eucrenophila*. (Schubert y Hegazi, 1988).

La descripción de *A.eucrenophila* publicada por Huys y col (1997) aportó los siguientes caracteres, en relación a la descripción original (Schubert y Hegazi, 1988). No produce pigmento marrón difusible. Presenta arginina dihidrolasa, pero no ornitina y lisina decarboxilasas, ni triptofano desaminasa. Es indol positiva. Utiliza como única fuente de carbono y energía, n-acetilglucosamina, L-aspartato, D-celobiosa, fumarato, D-galactosa, L-glutamina, L-malato, D-manitol, D-manosa, L-ornitina, putrescina, piruvato, D-ribosa, succinato, L-serina y tirosina. No utiliza aconitato, adipato, adonitol, β-alanina, azelato, citrato, citrulina, etanol, eritritol, D-gluconato, glutarato, 3 hidroxibenzoato, 4 hidroxibenzoato, itaconato, DL-lactato, lactosa, maltitol, melibiosa, malonato, oxoglutarato, fenilacetato, fenilalanina, propionato, D-rafinosa, suberato ni triptofano.

Produce ácido de D-celobiosa, D-galactosa, lactosa, D-maltosa, D-manitol y D-manosa, pero no lo produce de D-arabitol, eritritol, D-melibiosa, ni de rafinosa.

Resistente a ampicilina, amoxicilina, penicilina G, oxacilina y vancomicina, pero es sensible a amicacina, ceftaxima, cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, tetraciclina, tobramicina y trimetoprim.

El contenido en G+C del DNA está en el rango 58,8 a 60,7 mol%.

Cepa tipo LMG 3774 (=NCMB 74).

### **3.2.7. *Aeromonas sobria*.** (Popoff y Verón 1981).

[so.bri´a. M.L. fem adj *sobria*; moderada.]

Bacilos rectos, móviles por flagelo polar en medio líquido, (flagelación monotrica). Pueden observarse células solas o en parejas. No posee pigmento marrón difusible. Crece a 37°C. Produce indol en agua de peptona al 1%; no hidroliza esculina; no crece en caldo KCN; no utiliza L-histidina, L-arginina, salicina ni L-arabinosa; no fermenta salicina, pero si sacarosa y manitol; no degrada inositol. Produce gas de glucosa y sulfhídrico de cisteína. No presenta sistema ornitina descarboxilasa, pero si arginina dihidrolasa. No posee los sistemas de triptófano y fenilalanina desaminasa, ni ureasa. No hidrolizan esculina. Hidroliza almidón, gelatina, DNA y RNA. Degrada Tween 80. Fermenta galactosa, maltosa y trehalosa; pero no fermenta salicina, dulcitol, rhamnosa, inositol, xilosa, rafinosa ni adonitol. No degrada malonato, mucato ni D-tartrato.

Se pueden encontrar en aguas dulces y en aguas residuales, además de encontrarse en los peces.

El contenido en G+C del DNA es de  $58.7 \pm 0.6$  mol%

Cepa tipo: *CIP 74.33* (*CECT 837<sup>T</sup>*, *Popoff 208*, *CECT 4245<sup>T</sup>*, *ATCC 43979*)

**3.2.8. *A.jandaei*.** (Carnahan y cols 1992).

[jan.dae'i derivada del nombre de J. Michael Janda, microbiólogo norteamericano que ha contribuido ampliamente al conocimiento de las especies de *Aeromonas*, particularmente sobre sus biotipos e importancia clínica y las patogenicidades de los miembros mesofílicos]

Es móvil (25°C); Produce ácido y gas de glucosa; indol; lisina descarboxilasa; arginina dihidrolasa; o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido; reduce nitratos, utiliza citrato, y produce hemólisis en agar sangre de carnero.

Produce ácido de manosa y manitol. Es resistente a colistina (4µg/ml). Resistente a ampicilina, cefalotina, cefalozina, piperacina, imipemen y ticarcilina.

Es Voges-Proskauer positiva y produce H<sub>2</sub>S de cisteína. No hidroliza esculina, urea, ni elastina; no produce ácido de sacarosa, L-arabinosa, inositol, sorbitol, celobiosa, ni salicina; no posee sistema ornitina descarboxilasa.

Aislados de diferentes orígenes geográficos de muestras clínicas (lesiones en piel, sangre, heces ) y de muestras ambientales (langostinos).

Cepa tipo: ATCC 49568 (*CECT 4228<sup>T</sup>*, *CDC 0787-80*)

Recientemente Esteve y cols (2003) han enmendado la descripción de la especie *A.jandaei*, al incluir en la misma , cepas sacarosa-positivas aisladas de anguila.

**3.2.9. *A.veronii*.** (Hickman-Brenner y cols. 1987).

[Veh-rhón-ee-eye, derivado del nombre del científico francés M.M.Verón, microbiólogo que contribuyó al conocimiento de los géneros *Vibrio* y



*Aeromonas* y quien propusiera el nombre de la familia *Vibrionaceae* en 1965].

Crecen bien a 36°C y con esta temperatura han dado reacciones positiva a indol; rojo de metilo; Voges-Proskauer; lisina y ornitina descarboxilasa; producción DNasa, lipasa, fenilalanina desaminasa, y gelatinasa. Hidroliza esculina y tirosina; producen β-hemólisis en agar con sangre de carnero. Son móviles. Utilizan como fuente de carbono y energía, citrato, tartrato y acetato.

Produce ácido de D-glucosa, celobiosa, D-galactosa, glicerol, maltosa, D-manitol, D-manosa, α-metil-D-glucósido, salicina sacarosa y trehalosa. No producen ácido de adonitol, L-arabinosa, D-arabitol, dulcitol, eritritol, inositol, lactosa, melibiosa, raffinosa, L-ramnosa, mucato, D-sorbitol ni de D-xilosa.

Resistente a penicilina, ampicilina, carbenicillina, pero sensible a cloramfenicol, colistina, gentamicina y tetraciclina.

Aislada de muestras clínicas obtenidas a partir de heces y de esputos .

El contenido en G+C del DNA está en el rango 58-60mol%.

Cepa Tipo: *ATCC 35604T (CDC 1169-83<sup>T</sup>)*

En esta misma publicación de la descripción original de *A.veronii* (Hickman-Brenner y cols 1987) los propios autores alertaron de que las cepas clasificadas por Popoff y cols (1991) como *A.sobria* (grupo de hibridación 228), lo que después vino a ser denominado por Fanning y cols (1985) como *A.sobria* HG 8, pertenecían a la misma especie genómica que *A.veronii*. No obstante, estos autores nunca enmendaron la descripción propuesta para *A.veronii*, incluyendo estas cepas fenotípicamente próximas a *A.sobria* (ver apartado 3.2.7).

Es más, esta situación persiste en la actualidad en la denominación de *A.veronii* biogrupo *veronii* y *A. veronii* biogrupo *sobria*, a pesar de que no existe publicación alguna en la que formalmente se propongan y caractericen ambos “biogrupos”. Es más el único criterio existente en la bibliografía para diferenciar las cepas de *A.veronii* biogrupo *sobria*, de aquellas otras de la especie *A.sobria* está basado en el origen de los aislamientos. Es decir, se supone por parte de los autores que las cepas de origen clínico con fenotipo “*A.sobria*” pertenecen a la especie *A.veronii* (biogrupo *sobria*).

Por otra parte en la descripción original de *A.veronii* (Hickman-Brenner y cols 1987) se presentan dos cepas de *Aeromonas* ornitina-positivas que al no pertenecer al grupo genómico de *A.veronii* (HG 10) fueron denominadas *Aeromonas* sp HG 11, sin más estudios de homología DNA-DNA, las cuales deberían haber comprobado su relación con los grupos de hibridación 1 a 9.

Posteriormente una de estas cepas (ATCC 35942) fue clasificada por Martínez-Murcia y cols(1992) en la especie *A.allosaccharophila*.

### **3.2.10 *A.schubertii*.** (F: WW: Hickmann-Brener y cols, 1988).

[Derivado de nombre de Ralph H.W Schubert, microbiólogo alemán que contribuyó al conocimiento de los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*].

Crece bien a 36°C y con esta temperatura ha dado reacción positiva a los ensayos Voges Proskauer; producción de gelatinasa; lisina descarboxilasa; arginina dihidrolasa; movilidad; lipasa y Dnasa; producción de ácido de D-glucosa, D-galactosa, maltosa, D-manosa y trehalosa.

No produce ácido de adonitol, L-arabinosa, D-arabitol, celobiosa, dulcitol, eritritol, inositol, lactosa, D-manitol, melibiosa, rafinosa,

salicina, D-sorbitol, sacarosa, xilosa, ni de mucato. No hidroliza esculina, ni urea. No produce ornitina decarboxilasa. No crece en caldo KCN. No utiliza como fuente de carbono y energía, malonato, tartrato, ni acetato. No produce gas de glucosa.

Resistente a ampicilina, carbenicilina, kanamicina y penicilina, pero sensible a cefalotina, cloranfenicol, colistina, gentamicina, ácido nalidixico y tetraciclina.

Cepa tipo: *ATCC 43700* (*CECT 4240<sup>T</sup>*, *CDC 2446-81*).

### **3.2.11. A. *trota*.** (Carnahan y cols, 1992).

[Derivada del adjetivo griego “trotos”, que significa “vulnerable”].

Esta designación viene dada por la sensibilidad manifiesta de las cepas estudiadas a ampicilina y carbenicilina, y que sirven como elementos para diferenciar esta especie del resto, en principio.

Son móviles; presentan respuesta positiva a la producción de indol; producción de H<sub>2</sub>S a partir de cisteína, arginina dihidrolasa y de lisina descarboxilasa. A partir de glucosa, producen ácido y gas. Producen ácido de amigdalina, celobiosa, manitol y manosa. Son gelatinasa positivas y hemolizan la sangre de carnero. Utilizan citrato.

No hidrolizan esculina ni elastina. Son Voges Proskauer negativas; no producen ornitina descarboxilasa; no oxidan gluconato ni utilizan ascorbato. No producen ácido de L-arabinosa, inositol, L-ramnosa, salicina, ni de sorbitol.

Son resistentes a cefalotina, pero son sensibles a amicacina, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, imipemen, tetraciclina y sulfamidas potenciadas.

Aislada predominantemente de heces en pacientes de sudeste asiático.

Cepa tipo: *ATCC 49657<sup>T</sup>* (*CECT 4255<sup>T</sup>*, *AH2*, *LMG 12223<sup>T</sup>*).

**3.2.12. *A.allosaccharophila*.** (Martinez-Murcia y cols,1992).

[(A.lo.sa.ca.ro'phi.la. Gr.adj.*allos*, diferente; Gr.n.*saccharo*, azúcar; Gr.adj.*philos*, afinidad; M.L.adj. *allosaccharophila*, afinidad, gusto por diferentes azúcares)]

Bacilos rectos y móviles. No produce pigmento marrón difusible en agua. Crecen en presencia de NaCl en un rango de 0-3% (w/v). Produce ácido y gas de glucosa; son indol y  $\beta$ -galactosidasa positivas. No produce lisina descarboxilasa, ni H<sub>2</sub>S de tiosulfato. Crece entre los 4-24°C y también a pH 9 pero no a 4.5.

El ensayo Voges Proskauer es negativo. Produce ácido de sacarosa, D-celobiosa, maltosa, D-trehalosa, D-galactosa, D-manosa, D-glicerol, y D-manitol pero no de adonitol, salicina, arbutina, D-xilosa, lactosa, m-eritritol, dulcitol, m-inositol o D-sorbitol. Utilizan como única fuente de carbono y energía L-arabinosa, sacarosa, D-celobiosa, maltosa, D-trehalosa, D-galactosa, D-manosa, glicerol, D-manitol, L-histidina, L-arginina, L-prolina, L-glutamato, D-gluconato, fumarato y succinato; pero no crece en salicina, lactosa, m-eritritol, dulcitol, m-inositol, etanol, L-citrulina, L-leucina, L-alanina, glicina, L-serina, L-glutamina, DL-hidroxibutirato, propionato,  $\gamma$ -aminobutirato, D-glucuronato,  $\alpha$ -cetoglutarato ó putrescina.

Hidroliza gelatina, caseína, egg-yolk, Tween 80, almidón y DNA, pero no degrada urea, SDS o elastina. Sensible a gentamicina, nitrofurantoína, polymixina B, ácido oxolínico y nalidíxico, cloramfenicol, kanamicina, fosfomicina, eritromicina y rifampicina, pero es resistente a ampicilina, trimetropina, sulfadimethoxina ó estreptomina.

Esta especie puede diferenciarse de *A.sobria*, por su capacidad para utilizar L-arabinosa y L-histidina como única fuente de carbono y

energía. *A.allosaccharophila* presenta la capacidad de utilizar D-melibiosa y D-rafinosa.

A pesar de que la tesis defendida por el Subcomité de Taxonomía de *Aeromonas* y algunos autores (Huys y cols 1996), (Huys y cols 2001) sigue siendo que el estatus taxonomico de la especie *A.allosaccharophila* no es claro, lo cierto es que se siguen acumulando evidencias a favor de que *A.allosaccharophila* es un especie “bona fide”

Los aislamientos fueron realizados en anguilas enfermas, en piscifactorías de anguilas (Valencia) así como de las heces de un paciente en Carolina del Norte.

El contenido en G+C del DNA está en el rango 55.9-57.3 mol%.

Cepa tipo: *CECT 4199 (cepa 289)*.

### **3.2.13. *A. encheleia*.** (Esteve y cols,1995). Emend. Huys y cols.1997.

[(en.che'le.ia.Gr.n. enchelys, eel; M.L.adj.encheleia, de anguila.)]

Bacilos rectos, móviles, las colonias se desarrollan a las 24 hrs., a una temperatura de 28°C en TSA. No producen pigmento marrón difusible, sin embargo los cultivos viejos (10-15 días) muestran un ligero color marrón en el centro, Crece en agar MacConkey, pero no en TCBS. Crecen en presencia de NaCl del 0-3% NaCl (w/v), a temperaturas entre 4-37°C y en condiciones de alcalinidad (pH 9.0). Poseen sistema arginina dihidrolasa, y son indol positivos. No producen H<sub>2</sub>S de tiosulfato, ni lisina y ornitina descarboxilasas, Reacción Voges- Proskauer puede ser negativa.

Produce ácido de salicina, maltosa, D-manosa, D-trehalosa, D-galactosa y D-manitol, pero no producen ácido de L-arabinosa, D-celobiosa, lactosa, D-xilosa, D-melibiosa, D-rafinosa, eritritol ni de D-sorbitol, dulcitol e inositol.

Las cepas hidrolizan esculina, arbutina, gelatina, caseína, colágeno, quitina, Tween 80, albúmina de huevo y DNA, pero no degradan sulfato de condroitina, elastina, queratina ó urea. No presentan SDS-alkyl sulfatasa. Hemólisis de eritrocitos humanos, positiva.

Utilizan como única fuente de carbono y energía sacarosa, salicina, maltosa, D-manosa, D-trehalosa, L-prolina, L-serina, L-malato, fumarato y D-manitol, pero no usan L-arabinosa, D-celobiosa, L-rhamnosa, lactosa, D-rafinosa, L-arginina, L-citrulina, L-leucina, L-alanina, glicina, L-glutamina, L-tirosina, citrato, L-aspartato, DL-3-hidroxi-butirato, propionato, D-gluconato, D-glucuronato, oxoglutarato, inositol, eritritol, dulcitol, etanol, ni putrescina.

Sensible a amicacina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, tobramicina, eritromicina, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, oxolinico, polymyxin B, rifampicina, tetraciclina, y cloramfenicol. Resistente a penicilina V, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, sulfanilamida, sulfadimethoxina, fosfomicina, novobiocina, y trimetropina. No es patógena para ratón, el cuál se utiliza como modelo animal para valorar la virulencia potencial de las bacterias para humanos.

Aislada de anguila Europea (*Anguilla anguilla*). El contenido en G+C del DNA es de 60.0 mol %.

Cepa tipo: *S181<sup>T</sup>* (*CECT 4342<sup>T</sup>*).

Recientemente Huys y cols (1997) propusieron enmendar la especie dado que incluyeron en *A. encheleia* las cepas del grupo de hibridación 11 (*Aeromonas* sp 11), más tres cepas clasificadas originalmente como *A.eucrenophila*. (Schubert y Hegazi 1988). Su propuesta fué aceptada a pesar de que los datos de hibridación DNA-DNA que

presentaban eran contradictorios con los publicados por Esteve y cols (1995) y por Shubert y Hegazi (1988).

La descripción de *A. encheleia* publicada por Huys y cols, 1997, sólo aportó los siguientes caracteres, en relación a la descripción original. (Esteve y cols 1997) :

Crece en caldo KCN. No produce tritofano desaminasa. Utiliza piruvato y D-ribosa. No utiliza malonato, aconitato, adipato, adonitol, 4 hidroxibenzoato, itaconato, DL lactato, maltitol, melibiosa, mesaconato, fenilacetato, fenilalanina, sorbitol, suberato, tritofano ni xilosa. No produce ácido de adonitol, ni D-arabinosa. Resistente a oxacilina, vancomicina; pero sensible a cefotaxima, mezlocilina, metilmicina, piperacina y espectinomicina.

Aislada de agua dulce, anguila europea, anguila europea y una cepa fué de origen clínico. El contenido en G+C del DNA es de 59,2 mol% o de 60 mol%.

Cepa tipo LMG 16330 (= CECT 4342<sup>T</sup>)

#### **3.2.14. *A. popoffii*.** (Huys y cols, 1997).

[(*Po. popoffii*. M.L. gen. N. *popoffii*, derivado Popoff, Michel. Y. de Popoff, microbiólogo francés que ha contribuido en el conocimiento de las relaciones fenotípicas y genotípicas entre los miembros mesofílicos, del género *Aeromonas*]

Bacilos rectos y móviles. Temperatura óptima de crecimiento 28°C en medio TSA aunque en caldo crecen bien a los 37°C. No producen pigmento marrón difusible; pero si producen ácido y gas a partir de D-glucosa y glicerol. Crecen en caldo KCN pero no en presencia de NaCl al 3, 6, 8 y 10% (w/v). Poseen sistema arginina dihidrolasa, DNAsa y su reacción

en Voges-Proskauer es positiva. No producen ureasa, no poseen la triptófano desaminasa, ni ornitina y lisina descarboxilasa.

Utilizan los siguientes sustratos como única fuente de carbono y energía: N-acetil-glucosamina, L-aspartato, fumarato, D-galactosa, D-gluconato, D-glucosa, L-glutamato, L-glutamina, glicerol, L-histidina, L-malato, D-manitol, D-manosa, D-maltosa, putrescina, piruvato, D-ribosa, succinato, L-serina, D-trehalosa y L-tirosina.

No utilizan acetato, aconitato, adipato, adonitol, B-alanina, 4-aminobutirato, arbutina, azelato, D-celobiosa, citrulina, dulcitol, etanol, eritritol, D-glucoronato, glutarato, glicina, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, DL-hidroxibutirato, inositol, itaconato, lactosa, L-leucina, maltitol, melibiosa, mesaconato, L-ornitina, oxoglutarato, fenilacetato, L-fenilalanina, L-prolina, propionato, D-raffinosa, L-rhamnosa, salicina, D-sorbitol, D-sacarosa, L-triptófano ni xilosa.

Producen ácido de galactosa, D-manitol, D-manosa, metil-D-glucósido, y D-trehalosa pero no producen ácido de adonitol, D-arabitol, D-celobiosa, dulcitol, eritritol, inositol, lactosa, D-melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, salicina, D-sorbitol, D-sacarosa ni de D-xilosa.

Hidrolizan caseína, gelatina, lecitina, almidón Tween 80, pero no degradan quitina, ni esculina.

Resistentes a amoxicilina, ampicilina, claritromicina, oxacilina, penicilina G y vancomicina; pero son sensibles a amicacina, cefotaxima, cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, piperacilina, tetraciclina, tobramicina, trimetropin.

Aislamientos realizados en depuradoras y plantas potabilizadoras de agua.

Contenido G+C: 57.7\*-59.6 mol%.

Cepa tipo: *LMG 17541<sup>T\*</sup>* (*CECT 4995<sup>T</sup>*, strain *IK-O-a-10-3*).



**3.2.15. A. ichtiosmia.** (Schubert y cols. 1991).

[(Gr.n. ichthis pescado, Gr.n.osme olor, M.L. ichtiosmia, olor a pescado)].

Bacilos rectos, con extremos redondeados, móviles por flagelo polar, (generalmente monotricos). Metabolizan los carbohidratos produciendo ácido y gas como producto final (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). Producen acetoína en la fermentación de glucosa. Crecen en medios minerales con amonio como única fuente de nitrógeno y uno de los siguientes substratos, como única fuente de carbono: glucosa y ácido urocánico. Utilizan glucosa -6- fosfato, glucosa 1 fosfato, D-psicosa, sacarosa y turanosa. No fermentan L-arabinosa, gentiobiosa, lactosa, palatinosa ni sorbitol.

No utilizan esculina, salicina, arbutina ni prunasina. Producen indol a partir de triptófano, producen β-hemólisis en agar sangre de carnero. Hidrolizan la caseína, licuan gelatina, poseen DNasa. No descarboxilan la ornitina pero la reacción de la arginina deshidrogenasa es positiva. No degradan la urea. No crecen a 42°C. Temperatura máxima de crecimiento 39°C. Crecen en caldo KCN.

Aisladas de muestras de aguas superficiales y de muestras clínicas.

El contenido de G+C del DNA está en el rango de 59,2 a 59,8 moles %.

Cepa tipo: 115/II. (CECT 4486<sup>T</sup>, ATCC 49804<sup>T</sup>, LMG 12645<sup>T</sup>)

Recientemente Huys y cols (2001) han propuesto que los taxones *A.ichtiosmia* y *A.veronii* son idénticas, lo cual supondría que el nombre *A.ichtiosmia* es un sinónimo tardío del nombre *A.veronii*. Esta publicación aporta datos de hibridación DNA-DNA nuevos entre ambos taxones, no obstante también fundamenta sus conclusiones sobre datos filogenéticos aportados por otros autores (Collins y cols 1993).

**3.2.16. *A. enteropelogenes*.** (Schubert y cols, 1990).

[Gr.n. enteron intestino; Gr.n. pelos mud, excreción, heces, Gr. v. Gennaio, produce; M.L.adj. enteropelogenes, produce excreciones intestinales, (heces)].

Bacilos rectos, con extremos redondeados, móviles por flagelo polar (generalmente monotricos). Metabolizan los carbohidratos produciendo ácido y gas como producto final (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). No producen acetoina en la fermentación de la glucosa. Crecen en medios minerales con amonio como única fuente de nitrógeno y uno de los siguientes sustratos como única fuente de carbono: glucosa, salicina y ácido urocánico.

Utilizan celobiosa, gentiobiosa, glucosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato, D-psicosa, y D+ turanosa, pero no usan esculina, salicina, arbutina, prunasina y agmatina. No fermentan: acetilgalactosamin, arabinosa, fucosa, lactosa, palatinosa, sorbitol, ni sacarosa.

Producen indol de triptófano y β-hemólisis en placas de agar sangre de carnero. Hidrolizan caseína, licúan gelatina, producen Dnasa, lisin Descarboxilasa y arginina dihidrolasa, pero no descarboxilan ornitina ni degradan la urea.

Aisladas de heces humanas.

El contenido en G+C del DNA está en el rango de 60 a 60.8 moles %.

Cepa tipo: *J11*. (CECT 4487<sup>T</sup>, ATCC 49803<sup>T</sup>, LMG 12646<sup>T</sup>).

**3.2.17. *A. culicicola*.** (Pidiyar y cols. 2002).

[*Aeromonas culicicola* (cu.li'ci.co.la; N. l.n. *culicidae*, nombre de una familia en mosquitos, insecto huésped donde la bacteria ha sido aislada por primera vez, *-cola*, sufijo que significa: habitante de].

La cepa MTCC 3249<sup>T</sup> de *A.culicicola* es un bacilo recto móvil por flagelo polar. Presenta respuesta positiva a los siguientes ensayos: Voges Proskauer; producción de indol a partir de triptófano; citrato de Simmons; arginina dihidrolasa (Moeller) y decarboxilasa, ONPG, producción de gelatinasa, DNAasa y producción de amilasa. No produce ornitina descarboxilasa ni ureasa.

La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C aunque también puede crecer a 37°C en caldo LB. Muestra actividad hemolítica después de 18hrs de incubación a 37°C.

La cepa MTCC 3249 puede utilizar los siguientes sustratos como única fuente de carbono y energía: almidón, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-glicerol, glicógeno, D-maltosa, D-manitol, melibiosa, D-manosa, N-acetil glucosalina, sacarosa y ribosa. También produce ácido de todos estos sustratos.

Por otra parte no produce ácido de adonitol, amigdalina, D-arabinosa, L-arabinosa, D-arabitol, arbutina,  $\alpha$ -gentibiosa, celobiosa, dulcitol, eritritol, esculina, DL-fucosa, inositol, inulina, 2-ceto-gluconato, lactosa, melecitosa, D-rafinosa, ramnosa, salicina, sorbitol, L-sorbitol, D-tagatosa, D-turanosa, xilitol, D-xilosa.

*Aeromonas culicicola* MTCC 3249<sup>T</sup> es resistente a ampicilina y amicacina pero sensible a cefadroxil, cefriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina y norfloxacina. Muestra por otra parte resistencia intermedia a cefoperazona, cefotoxima, cotrimoxazol, gentamicina, netilmicina y penicilina.

Aislada de mosquito *Culex quinquefasiatus* y *Aedes aegyptii*.

Cepa tipo MTCC 3249 (=NCIMB 5147<sup>T</sup>)

**3.2.18. *Aeromonas simiae* IBS S6874<sup>T</sup> (Harf-Monteil y cols. 2004).**

[(si'mi.ae. Gr. n. *simia* monkey; N.L.adj simio de monos)].

Bacilos rectos con flagelo polar. No crecen en NaCl al 6%. Temperatura óptima de crecimiento es de 30°C en TSA o en agar sangre, pero pueden crecer a 42°C, después de 24hrs. No producen indol, gas de glucosa ó  $\beta$ -hemólisis en placas agar sangre de carnero. Los tests Voges-Proskauer y ornitina descarboxilasa son negativos; pero presenta respuesta positiva para lisina descarboxilasa y arginina dihidrolasa; y para la pyramizinamidasa. Hidrolizan esculina y la producción de arbutina es variable.

Producen ácido de glicerol, ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetylglucosamina, D-celobiosa, D-sacarosa, D-maltosa, D-trehalosa, almidón, glucógeno y gluconato.

No producen ácido de: erytritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, metil  $\alpha$ -D-glucosido, sorbosa, rhamnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, amigdalina, melibiosa, inulina, melecitosa, rafinosa, xilitol, gentibiosa, turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, 2-cetoglutarato, 5-cetogluconato, salicina o lactosa.

Sensible a cefalotina pero es resistente a ampicilina. La cepa tipo ha sido aislada a partir de heces del mono (*Macaca fascicularis*) proveniente de Islas Mauricio y que se encuentra confinado en cuarentena el Centro de Primatología, Louis Pasteur, en Strasbourg, Francia.

Cepa Tipo: IBS S6874 (=CIP 107798<sup>T</sup>=CCUG 47378<sup>T</sup>).

**3.2.19. *Aeromonas molluscorum*. (Miñana- Galbis y cols. 2004).**

[*Aeromonas molluscorum* (mol.lus.co'rum. N.L. pl. n. Mollusca phylum zoológico; N.L. gen. pl. n. molluscorum, de moluscos clasificados en el Phylum *Mollusca*)].

Bacilos rectos, móviles por flagelo polar crecen en el rango 4-37°C, pero no a 40.5°C.

No produce indol, ni pigmento marrón difusible, ni “swarming”, ni gas de glucosa y tampoco produce H<sub>2</sub>S a partir de cisteína, ni de tiosulfato. Respuesta positiva a ensayos de ADH, rojo de metilo y ONPG, pero es negativa para VP, LDC y ODC. Crece en Agar MacConkey. Crece en NaCl para concentraciones del 0-3% y a pH 9, pero no crece en NaCl al 6% ó a pH 4,5. Hidrolizan arbutina, DNA, esculina y gelatina, pero no degradan almidón, elastina, urea o xantina.

Producen ácido de L-arabinosa, dextrina, D-galactosa, glicerol, D-manitol, D-manosa, D-sacarosa y D-trehalosa pero no producen ácido de lactosa, D-melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, sorbitol o D-xilosa.

Utilizan como única fuente de carbono y energía L-arabinosa, arbutina, L-arginina, citrato, esculina, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, L-histidina, maltosa, D-manitol, D-manosa, N-acetil-glucosamina, D-sacarosa, y trehalosa, pero no usan adonitol, dulcitol, inositol, inulina, lactosa, D-melecitosa, D-melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, sorbitol, L-sorbosa o D-xilosa.

Resistentes a eritromicina (15µg) y penicilina G (10µg), pero sensibles a: estreptomina (10µg), ampicilina (30µg), ceftriaxon (30µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), colistin (50µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), polimixina B (300 U), tetraciclina (30µg), tobramicina (10µg) y trimetropina+sulfametoxazol (1.25µg + 23.75µg).

El contenido en G+C del DNA es de 59-59.4 mol %.

Cepa Tipo: 848<sup>T</sup> (=CECT 5864<sup>T</sup>=LMG 22214<sup>T</sup>).

#### **4. Sistemas de identificación en *Aeromonas*.**

Un gran número de esquemas de identificación han sido propuestos a lo largo de la historia de *Aeromonas* pero su introducción fuera de los marcos de los laboratorios en los que se han concebido, han sido desafortunados y con muy pocos reportes de utilización.

Este género además es antigenicamente diverso, por ello se han desarrollado múltiples esquemas de identificación basados, en la presencia del único determinante termoestable somático (O). De los esquemas propuestos, el más utilizado ha sido el de Sakazaki y Shimada (1984).el cuál reconoce 44 serogrupos y 55 serorupos adicionales provisionales dentro del género; por medio de este sistema se han definido importantes serogrupos, por ejemplo el O:11, responsable de serias infecciones clínicas como septicemias, meningitis, y peritonitis, además del grupo O:34 responsable de infecciones humanas de la piel como, myonecrosis y epizootias en goldfish.

Carnahan y Joseph, han empleado un sistema de identificación basado en una matriz de frecuencia (SAS/TAXAN<sup>R</sup>) que deriva en una subdivisión de tests convencionales discriminatorios para identificar *Aeromonas* en laboratorios clinicos. Escogieron 18 tests de los 50 iniciales para construir dos claves dicotomicas de “multinivel” desarrolladas por Berham y colegas, y se denomina FLOABN (1991c). FLOABN ha sido escrito como una modificación de un algoritmo desarrollado y publicado en programa PASCAL para la identificación de especies bacterianas.

La primera clave de identificación “*Aerokey I*” se basa en la formación de clusters o de cepas únicas, en representación de todos los

grupos de hibridación DNA-DNA reconocidos (sólo del 1-14) y emplea 12 de los 18 tests discriminatorios para diferenciar entre dichos grupos de hibridación. Esta clave no fué nunca publicada porque algunos grupos de hibridación sólo estuvieron representados por una ó un par de cepas, quedando en perspectiva su utilización posterior con una mayor representación de aislados dentro de estas “raras genospecies”.

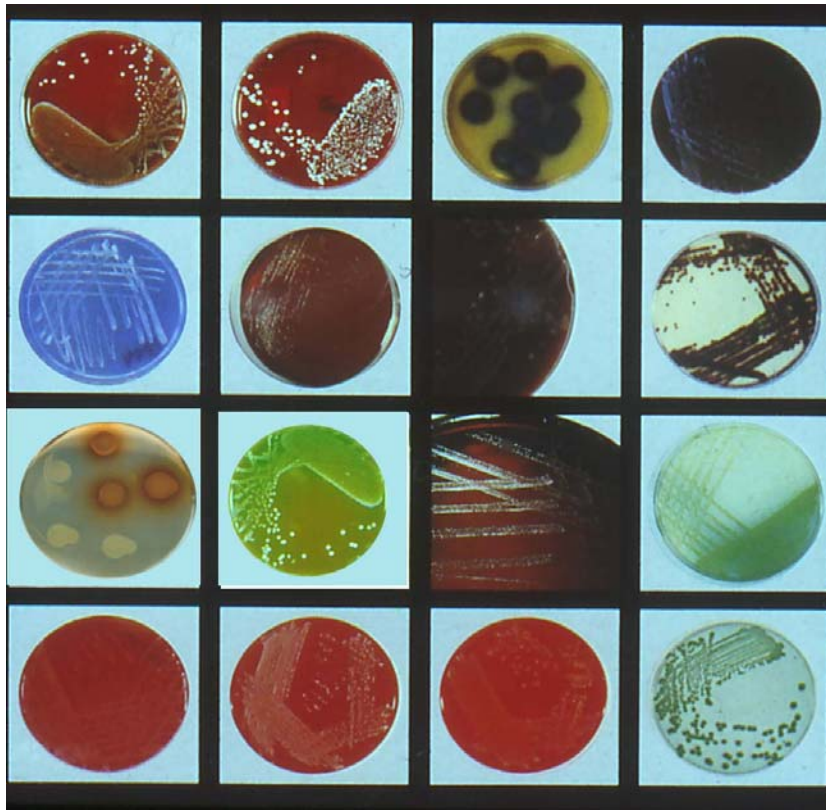
La segunda clave dicotómica “*Aerokey II*”, se basó en los clusters que contenían los mayores grupos de especies de relevancia clínica: Clusters que involucraron a *A.hydrophila* (arabinosa positiva y arabinosa negativas), *A.veronii* biovar *sobria*, *A.caviae*, *A.veronii* biovar *veronii*, *A.schubertii*, *A.jandaei*, y *A.trota*. Siete de los 18 tests discriminatorios originales fueron utilizados para construir el “*Aerokey II*”, y su validez se confirmó por ser exacto al identificar en un 97% de 60 aislados de *Aeromonas* de origen clínico provenientes de un laboratorio independiente y el 100% de 18 cepas de referencia de la ATCC, para la identificación de las nuevas especies anteriormente mencionadas. “*Aerokey II*” ha sido modificado por otros microbiólogos en el campo trayendo como resultado la publicación del “*Aeroscheme*”

A partir de 1992, se comenzaron a realizar los estudios que involucran la relación entre fenotipo y genotipo entre *Aeromonas*. El primero de estos estudios fué llevado a cabo por Kämper y Altwegg, utilizando los coeficientes de similaridad  $S_M$  y  $S_J$  para el programa de algoritmo UPGMA, ellos obtuvieron, 16 clusters y 7 cepas aisladas para un nivel de similaridad del 93%. Los HGs 1, 4, 5, 6, 7, 9, 12, y 14 estuvieron representados por un solo cluster ó fenon y los grupos de hibridación HGs 2 y 3 mostraron una relación muy estrecha por su parte. Los datos fenotípicos obtenidos estuvieron correlacionados, fueron congruentes con los taxones

obtenidos por hibridación *DNA-DNA* y por análisis enzimático (“multilocus enzyme analysis”). Ellos utilizaron 30 caracteres diagnósticos para la construcción de la matriz de similaridad (Wilcox, >0.99) para un porcentaje de identificación de 71.51%, y al utilizar dicho coeficiente a >0.90, obtuvieron un 83,7%, para una correcta identificación. El segundo trabajo fué llevado a cabo por Abbott y colegas (1992), quienes proponen una batería de 58 pruebas bioquímicas, para la mayoría de los grupos de hibridación *DNA-DNA*, no obstante, para la identificación de todas las especies y grupos se requieren de pruebas adicionales específicas. La extensión de este trabajo fué dada por Janda y Abbott (1996) para determinar la correlación existente entre genomaspecies y designaciones serológicas, en más de 200 aislados de *Aeromonas* de diversas fuentes u orígenes (clínico, animal y ambiental).

Las cepas fueron identificadas hasta nivel de especie mediante el esquema de Abbot y cols (1992) de 18 tests bioquímicos [oxidasa, indol, gas de glucosa, ornitina, lisina descarboxilasa y arginina dihidrolasa, hidrolisis de esculina, producción de acetilmetilcarbinol (Voges Proskauer), hemolisis en agar sangre de carnero, producción de elastasa, oxidación de gluconato de potasio, producción de sulfito de hidrogeno en el medio gelatina-cysteina-thiosulfato y fermentación de L-arabinosa, D-manitol, salicina, manosa, celobiosa y sacarosa. Para algunos aislados fué necesario incluir pruebas adicionales para su identificación a nivel de especie, como: fermentación de glicerol, L-rhamnosa, y sorbitol y utilización de citrato de sodio, DL-lactato, ó ácido urocánico], con la excepción de que los resultados finales fueron registrados a 72h más, luego de 7 días.





**Fig. n°1.** Pruebas fisiológico- bioquímicas generales en placas para identificación y caracterización de *Aeromonas*. (NCTC)

Los aislados de *Aeromonas* fueron serogrupo por el esquema de tipaje antigénico de Sakazaki y Shimada. (1984).

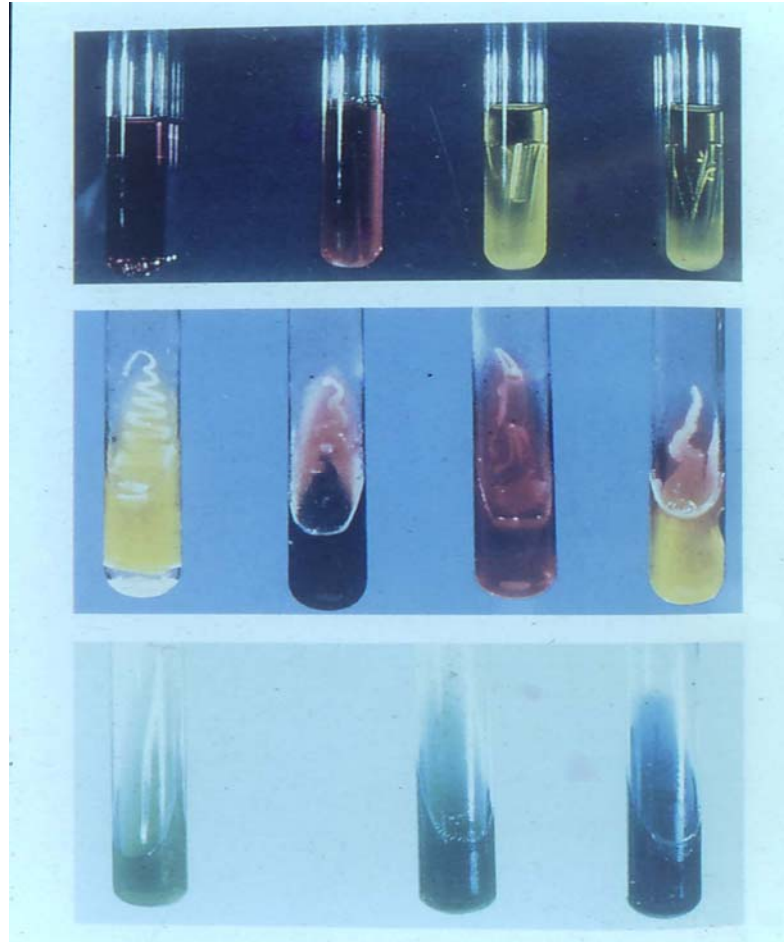
Alrededor del 97% de las cepas fueron identificadas a nivel de genomoespecie, mediante dicha batería de tests bioquímicos. Los miembros del llamado “complejo *Aeromonas hydrophila*” (*A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida*), hasta el momento difíciles de separar a nivel bioquímico, fueron fáciles de distinguir, según los autores, del resto de los aislados por medio de propiedades fenotípicas tales como: utilización del DL-lactato y el ácido urocánico. Encontraron diferencias en la distribución de las especies, sobre la base de sus orígenes, al analizar los serogrupos, obtuvieron que cada

genomospecie es serológicamente heterogénea, y que serogrupos individuales pueden encontrarse en mas de una especie, que muchas cepas tipo o de referencia, para cada grupo de hibridación, no son serológicamente representativas de las genomoespecies, que los serogrupos O:11, O:34, y O:16 predominantemente clínicos, (48%), reafirman lo que estudios previos han señalado en cuanto a su importancia en infecciones humanas, y por último que *A.trota* no expresa el antígeno O139 de *Vibrio colera*. El resultado en general aporta que tanto las designaciones de especies y de serogrupos son factores importantes para determinar a nivel de laboratorio clínico cuál de los aislados puede ser un agente causal de enfermedades humanas.

Estos trabajos abordan y muestran que es posible el estudio de la segregación fenotípica de las *Aeromonas móviles*, sin embargo este esfuerzo por parte de los investigadores contrasta con la información recogida en la última edición de “*Prokariotes*”, (Farmer y col., 1992), donde solamente han sido reflejadas las especies de *Aeromonas* (*A.hydrophila*, *A.sobria* y *A.caviae*), con los esquemas de identificación originalmente propuestos por Popoff (1984), además de incluirse a *A.veronii* y *A.schubertii*.

Más recientemente y según datos obtenidos en este estudio, hemos propuesto y publicado nuestra serie de 135 pruebas bioquímicas para la identificación y caracterización de casi todos los representantes de los grupos de hibridación actuales en el género *Aeromonas*.

Shaw y Hooder (1978) utilizaron el análisis lipopolisacárido para examinar un grupo de *Aeromonas móviles*, como medio de clasificación taxonómica. Las cepas examinadas se dividieron en tres grupos distintos sobre la base de varias combinaciones de residuos de hexosa y heptosa, esta misma distribución fue la que obtuviese Popoff (1976).



**Fig. n°2.** Pruebas bioquímicas en tubos, medio líquido para producción de gas y metabolismo de nutrientes, medio sólido asimilación de sustratos y producción de ácido. (NCTC).

En *Aeromonas* los tres mayores complejos fenotípicos esterasas, glutamato deshidrogenasa, lactato y malato deshidrogenasa fueron analizados por electroforesis e isoelectroenfoque. (Picard y Goulet). Se definieron 8 zymotipos especie-específicos sobre la base de sus puntos isoeléctricos, para la malato deshidrogenasa y la movilidad de la lactato

deshidrogenasa, correlacionándose con lo previamente descrito y establecido para los grupos de hibridación DNA de Popoff y Verón, lo que enmarca a esta técnica como útil en cuanto a marcadores epidemiológicos. Sin embargo esta técnica no es perfecta por cuanto no correlaciona las especies genómicas que se han definido por hibridación DNA-DNA.

Otros métodos, han sido utilizados para identificación de *Aeromonas* hasta nivel de especie, y algunos de ellos exhibiendo una excelente correlación entre las genoespecies definidas y los datos obtenidos por hibridación DNA-DNA, como por ejemplo el tipaje bacteriofagos, electroforesis de proteínas y el serotipado, con un valor mayor o menor en taxonomía, pero importantes en las investigaciones epidemiológicas.

El análisis cromatográfico gas-líquido de los ácidos grasos metil-esters (FAMEs) ha mostrado una alta similaridad entre todas las cepas de *Aeromonas* y los grupos analizados, pueden ser usadas variaciones cuantitativas menores al diferenciar fenoespecies y/o grupos de hibridación DNA. Los complejos fenotípicos *A.hydrophila*, *A.sobria* y *A.caviae* fueron agrupados básicamente en distintos clusters FAMEs, estos datos se corresponden con otros estudios realizados anteriormente, pero no con los determinados para los diferentes grupos de hibridación DNA. Las diferencias en menor grado en FAME, pueden explicarse por las diferentes condiciones de cultivo y los diferentes grupos de cepas empleadas. La utilidad de la técnica de análisis de ácidos grasos metil esters (FAMEs) para

asignar las cepas de *Aeromonas* a fenospecies en particular o a grupos de hibridación fue realizado con cepas aisladas de 5 plantas de producción de agua potable, o sea de origen ambiental.

El ribotipado actualmente es una técnica clave en las investigaciones epidemiológicas, las bandas del RNA ribosomal obtenidas por análisis de restricción muestran una muy buena correlación con los datos de hibridación DNA-DNA. EL DNA cromosomal de alto peso es digerido “cortado” con enzimas de restricción. En *Aeromonas* se han empleado las enzimas *PstI* y *SmaI* para digerir el DNA cromosomal y el plásmido pGML1, que contiene unas 832 pares de bases insertadas, que representan una parte del gen 16SrRNA de *E.coli*. Si se realiza un ribotipado utilizando rDNA ó el plásmido pKK3535 que contiene el operón entero que codifica para los genes 16S, 5S y 23 rRNA de *E.coli*, obtenemos una excelente clave para las investigaciones epidemiológicas en *Aeromonas*. La correlación que se espera utilizando esta técnica en relación con los datos de hibridación ó los grupos taxonomicos establecidos, no queda establecida para patrones de bandas pesadas (3-4 kilobases), pero si con bandas pequeñas (0.8-4 kb) cuando la hibridación se realiza con el plásmido pGML1, el cuál es un pGEM11zf(+) que contiene un fragmento de 576 pb que con *HindIII* representa una región del extremo 5' del gen de *E.coli* 16S rRNA.y en esto radica su valor taxonómico.

La técnica de tipado AFLP. (Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados. “Amplified fragment length polymorphisms”), es

una técnica genómica desarrollada recientemente, que detecta los polimorfismos del DNA por amplificación selectiva de los fragmentos de restricción. (Vos y cols, 1995). Ha sido utilizada en cepas de *Aeromonas* con resultados satisfactorios pero no concluyentes. (Huys y cols 1996a, 1996b). La comparación de las bandas amplificadas obtenidas, se facilita al utilizar los análisis por computadora, que ofrecen además, datos cuantitativos, y generan dendrogramas que dan como resultado, grupos homogéneos de cepas. La utilidad del método se aprecia cuando se analizan grandes cantidades de cepas, los resultados han sido corroborados por la técnica del ribotipado, pero el AFLP no resuelve hasta el momento las diferencias que se aprecian al comparar con los datos que se obtienen por hibridación DNA-DNA; si bien discrimina la mayoría de los grupos establecidos, presenta algunos problemas a nivel taxonomico por la aparición de heterogeneidades intraespecificas en los patrones del DNA y los patrones deben interpretarse con cautela..

Los genes que codifican para el RNA de las pequeñas subunidades de ribosomas (16S rDNA) tienen una secuencia nucleotídica relativamente conservada que precisamente reflejan la filogenia bacteriana, según la técnica del 16S DNA-ribotipado.

Martinez-Murcia y colaboradores han determinado para muchas especies genómicas del género *Aeromonas* las respectivas secuencias, a partir de aquí han sido estructurados los árboles filogenéticos o dendrogramas. Muchas especies exhiben muy altos niveles de similaridad a lo largo de toda la

secuencia (98-100%) y por otra parte ha distinguido en una línea evolutiva distinta a la subclase gamma de *Proteobacteria*. (Martinez-Murcia y cols, 1992a; Martinez-Murcia y cols, 1999). Las sondas diseñadas para *Aeromonas* basadas en el rDNA 16S han sido establecidas para la detección específica de *A.veronii*, *A.jandaei*, *A.schubertii*, (Ash y cols, 1993a, b), *A.salmonicida* (O'Brien y cols, 1994) y para *A.hydrophila*. (Dorsch y cols, 1994).

Uno de los trabajos más recientes para la discriminación de especies en *Aeromonas* ha sido propuesto por Figueras y cols (2000), un método basado en el análisis del gen 16S ó pequeña subunidad del gen ribosómico, (**16S rDNA RFLP**), y es una extensión del protocolo propuesto en origen por Borrell y cols. (1997), donde las bandas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) obtenidas luego de una amplificación por PCR del gen, fueron capaces de distinguir más de 10 especies de *Aeromonas*, utilizando las endonucleasas *AluI*, *MboI*, en *Aeromonas* sp, *NarI* y *HaeIII* para distinguir *A.salmonicida* y *A.encheleia* del HG 11, incluye además a *A.bestiarum* y *A.popoffi* especies no incluidas en el estudio preliminar, así como otras de las enzimas de restricción más específicas: *PstI*, *SfaI* y *AlwNI*, con resultados muy satisfactorios en cuanto a identificación, rapidez y coste. Mediante la técnica de RFLP se han identificado 1302 cepas de *Aeromonas* en los laboratorios de los doctores Figueras y Martinez-Murcia. Como consecuencia de la presencia de diversidad nucleotídica intra-específica o debido a la presencia de una nueva

secuencia perteneciente a alguna especie de *Aeromonas* aún no descrita, pueden aparecer perfiles electroforéticos diferentes a los descritos.

En *Aeromonas*, muchos autores han incursionado con la técnica PFGE. Threlfall. J.E y cols,1996) para el estudio de la diversidad genética tanto de las especies psicrófilas de *A.salmonicida*, como de las mesófilas y en la determinación del mapa físico y genético en *A.salmonicida* A449 (PFGE seguido de Southern blotting). Mediante esta técnica se han obtenido perfiles de restricción característicos de muchas de las especies del género, pero no se ha logrado establecer correlación dentro de los grupos de hibridación DNA-DNA propuestos, como tampoco un patrón de bandas característico que delimite dichos grupos de hibridación, excepto para el grupo *Aeromonas salmonicida* donde incluso se ha determinado un mapa genético. Las nuevas subespecies, no han sido consideradas en estos estudios. (Umelo y Trust, 1998; Häninnen y Siitonen, 1995; Häninnen y Hirvela-Koski, 1997; Livesly, M. A. y cols 1997; Chomarat y cols 1998; Häninenn M,L y Hirvela-Koski,1999; Bronagh O'hici y cols, 2000).



## OBJETIVOS.

A pesar de la importancia clínica y veterinaria de las especies del género *Aeromonas* y de su distribución ubicua en ambientes acuáticos de todo el mundo, no existen patrones fiables de diagnóstico fenotípico que puedan ser empleados en los laboratorios tanto clínicos como veterinarios, o de control de calidad. Las razones de este hecho son diversas. En primer lugar, la taxonomía del género *Aeromonas* ha experimentado grandes cambios en cuanto al número de especies descritas, que se ha duplicado en los últimos años quince años pasando de 9 a 19 especies de *Aeromonas* en la actualidad.

No obstante, los límites taxonómicos de algunas de estas especies siguen siendo cuestión de controversia, y por tanto, cuales sean sus atributos fenotípicos (caso de *A.veronii*/*A.ichtiosmia*/*A.allosacharophila*; *A.trota*/*A.enteropelogenes*; *A.encheleia*/*A.eucrenophila*/*Aeromonas sp* HG 11), existen especies de *Aeromonas* que siguen incluyendo cepas muy dispares en cuanto a sus rasgos fenotípicos (caso *A.veronii* biogrupo *veronii*/*A. veronii* biogrupo *sobria*).

En segundo lugar, la cantidad y calidad de las distintas especies de *Aeromonas* es muy desigual, lo que dificulta su comparación a nivel fenotípico. Este hecho además, introduce confusión acerca de cuáles son los rasgos fenotípicos con valor diagnóstico en la identificación de las especies de *Aeromonas*.

Así pues, a pesar de que los trabajos realizados en la última década han sido de gran valor para comprender la diversidad del género, persisten en la actualidad estos problemas y controversias en la taxonomía del género *Aeromonas*.

El objetivo de este trabajo es estudiar extensamente las especies móviles y mesófilas, descritas en el género *Aeromonas*, incluyendo las cepas, de referencia “bona fide” que han sido mencionadas en la bibliografía en los últimos 25 años, para así aportar datos fenotípicos y genéticos que permitan esclarecer las discrepancias taxonómicas del género. De este modo pretendemos, además, conocer cuáles son los caracteres (principalmente fenotípicos) con valor diagnóstico para la identificación de las especies de *Aeromonas*.

Este objetivo será desarrollado según los siguientes aspectos del plan de trabajo:

- I. Recuperación, cultivo y mantenimiento de cepas de referencia de *Aeromonas* y de otros aislados.
- II. Caracterización fenotípica y análisis numérico de los perfiles fenotípicos presentes en las cepas.
- III. Estudio genético mediante hibridación DNA-DNA de los grupos de cepas que presenten resultados fenotípicos controvertidos en comparación con los datos bibliográficos.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

**1. Caracterización fenotípica:** Métodos de conservación y mantenimiento de las cepas empleadas. Estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de las cepas de *Aeromonas*.

### 1.1 Cepas bacterianas:

Las cepas incluidas en este estudio (n= 153) son mostradas en las tablas n° 7 y 8. Hemos estudiado 66 cepas tipo y de referencia “bona fide” para las que hay publicados datos genómicos de hibridación DNA-DNA (Tabla n°7). Entre estas se encuentran las que Popoff y cols (1981) asignaron como referencia de sus grupos de hibridación (Popoff 543, Popoff 218, Popoff 545, Popoff 546, Popoff 208 y Popoff 224) junto con otras incluidas por estos autores en dichos grupos genómicos (Tabla n°7).

También se incluyen las cepas reconocidas por el CDC (*Center for Disease Control*) como referencia de los grupos de hibridación 8 al 17 (Joseph y Carnahan 2000). Como se aprecia en la Tabla n°7, la mayoría de estos grupos genómicos corresponden en la actualidad a especies nombradas. Finalmente destacar que para alguna de estas cepas han sido caracterizadas réplicas procedentes de diferentes colecciones de cultivo.

Por otra parte hemos estudiado 79 cepas para las que no hay datos genómicos de hibridación DNA-DNA, publicados. (Tabla n°8). Entre estas se encuentran algunas previamente estudiadas por otros autores. Esteve 1995; Kodjo y cols 1977; Altwegg y Kampfer 1992; Huys y cols 1996 y 1997) y también nuevos aislamientos recuperados de caracol, anguila y muestras clínicas (Tabla n°8). Finalmente destacar que se han incluido en el trabajo muchas cepas del Dr. Altwegg generalmente utilizadas como referencia de *A.veronii* biogrupo *sobria*.

**Tabla nº7.** Cepas de referencia del género *Aeromonas* incluidas en este estudio (se incluyen a su vez datos de homología DNA/DNA publicados).

Especies	DH G <sup>a</sup>	Cepa no. <sup>b</sup>	Designación con la que se ha recibido. (Otro[s]) <sup>b</sup>	Fuente de aislamiento
<i>A. hydrophila</i>	1	CECT 839 <sup>T</sup>	DSMZ 30187 <sup>T</sup> (ATCC 7966 <sup>T</sup> , LMG 2844 <sup>T</sup> , Popoff 543 <sup>T</sup> )	Brik de leche con olor a pescado
<i>A. bestiarum</i>	2	CECT 4227 <sup>T</sup>	CIP 74.30 <sup>T</sup> (ATCC 51108 <sup>T</sup> , Popoff 218 <sup>T</sup> )	Pescado.
<i>A. salmonicida</i>	3	CECT 894 <sup>T</sup> CECT 4235	NCIMB 1102 <sup>T</sup> (ATCC 33658 <sup>T</sup> ) NCIMB 833 (ATCC 14174, Véron 29)	Salmón Atlántico Trucha parda
<i>A. caviae</i>	4	CECT 838 <sup>T</sup> CECT 4221 CECT 4222 CECT 4226	DSMZ 30190 <sup>T</sup> (ATCC 15468 <sup>T</sup> , Popoff 545 <sup>T</sup> ) ATCC 15467 (LMG 3755, Popoff 544) NCIMB 9235 (ATCC 13137, Popoff 268) NCIMB 9234 (ATCC 13136, LMG 3741, Popoff 267)	Cerdo de Guinea Aceite emulsionado Aguas residuales Aceite emulsionado
<i>A. media</i>	5B	CECT 4232 <sup>Te</sup> CECT 4233 <sup>T</sup>	ATCC 33907 <sup>T</sup> (LMG 9073 <sup>T</sup> , cepa RM <sup>T</sup> ) ATCC 33907 <sup>T</sup> (LMG 9073 <sup>T</sup> , cepa RM <sup>T</sup> )	Efluyente de piscifactoría. Efluyente de piscifactoría
<i>A. eucrenophila</i>	6	CECT 4224 <sup>T</sup> CECT 4824 <sup>c</sup> CECT 4825 <sup>c</sup> CECT 4826 <sup>c</sup> CECT 4827 CECT 4853 CECT 4854 CECT 4855	NCIMB 74 <sup>T</sup> (ATCC 23309 <sup>T</sup> , LMG 3774 <sup>T</sup> , Popoff 546) CCUG 30346 (LMG 13062, cepa 1/II) CCUG 30347 (LMG 13691, cepa 23/II) CCUG 30345 (LMG 13061, cepa BPE113) CCUG 30341 (LMG 13057, Popoff 546) CCUG 30342 (NCIMB 73, LMG 13058) CCUG 30343 (LMG 13687, cepa K 2232/1) CCUG 30344 (LMG 13060, cepa 37/20b)	Ascitis de carpa Agua de suelos. Agua de suelos Agua. Ascitis de carpa Ascitis de carpa Vertido urbano Vertido rural.
<i>A. sobria</i>	7	CECT 837 <sup>T</sup> CECT 4245 <sup>T</sup> CECT 4249 CECT 4251 CECT 4252 CECT 4821	NCIMB 12065 <sup>T</sup> (ATCC 43979 <sup>T</sup> , LMG 3783 <sup>T</sup> , Popoff 208 <sup>T</sup> ) CIP 74.33 <sup>T</sup> (ATCC 43979 <sup>T</sup> , LMG 3783 <sup>T</sup> , Popoff 208 <sup>T</sup> ) JCM 2138 (Popoff 207) JCM 2142 (Popoff 215) JCM 2143 (Popoff 228) CCM 2808 (Popoff 217)	Pescado Pescado Pescado Pescado Pescado Esturión

Especies	DH G <sup>a</sup>	Cepa no. <sup>b</sup>	Designación con la que se ha recibido. (Otro[s]) <sup>b</sup>	Fuente de aislamiento
<i>A. sobria</i>	8	CECT 4835	ATCC 51106 (CDC 0437-84, Popoff 224).	Pescado
		CECT 4246 <sup>e</sup>	NCIMB 37(ATCC 9071,Popoff 311)	Rana.
		CECT 4247	NCIMB 37(ATCC 9071,Popoff 311)	Rana.
		CECT 4250	NCIMB 37(ATCC 9071,Popoff 311)	Pescado.
		CECT 4831	JCM 2140 (Popoff 209)	Pescado.
		CECT 4832	JCM 2144 (Popoff 232) JCM 2145 (Popoff 236)	Pescado
<i>A. jandaei</i>	9	CECT 4228 <sup>T</sup>	ATCC 49568 <sup>T</sup> (CDC 0787-80 <sup>T</sup> , LMG 12221 <sup>T</sup> )	Heces humanas
		CECT 4229	ATCC 49570 (LMG 13077, strain WR11/4658)	Herida, lesión.
		CECT 4231	ATCC 49572 (CDC 1081-81, LMG 13078, strain AS-167)	Camarón
		CECT 4813	CCUG 30350 (CDC 1530-81, LMG 13065)	Heces humanas
		CECT 4838	ATCC 49569 (strain AS-14)	Sangre
		CECT 4901	LMG 13079 (ATCC 49571, strain NMRI-6)	Pierna herida
<i>A. veronii</i>	10	CECT 4257 <sup>T</sup>	NCIMB 13015 <sup>T</sup> (ATCC 35624 <sup>T</sup> , CDC 1169-83 <sup>T</sup> , LMG 9075 <sup>T</sup> )	Esputo
		CECT 4258 <sup>e</sup>	ATCC 35622 (CDC 0140-84)	Heces humanas
		CECT 4259	ATCC 35623 (CDC 0964-83)	Heces humanas
		CECT 4260	ATCC 35625 (CDC 1170-83)	Herida, lesión
		CECT 4261	ATCC 35626 (CDC 1305-83)	Cavidad maxilar
		CECT 4819	LMG 16183 (CDC 1067-84)	Heces humanas
<i>Aeromonas</i> sp.	11	CECT 4253 <sup>c</sup>	ATCC 35941 (CDC 1306-83, LMG 13075)	Pierna herida
		CECT 4856 <sup>c</sup>	LMG 13076 (CDC 3136-78)	Agua.
<i>A. schubertii</i>	12	CECT 4240 <sup>T</sup>	ATCC 43700 <sup>T</sup> (CDC 2446-81 <sup>T</sup> , LMG 9074 <sup>T</sup> )	Tumor o absceso frontal.
		CECT 4243	ATCC 43945 (CDC 2508-86)	Herida
		CECT 4244	ATCC 43947 (CDC 0463-83)	Fluido pleural
<i>Aeromonas</i> sp.	13	CECT 4254	ATCC 43946 (CDC 2478-85)	Pierna herida
<i>A. trota</i>	14	CECT 4255 <sup>T</sup>	ATCC 49657 <sup>T</sup> (LMG 12223 <sup>T</sup> , cepa AH2)	Heces
		CECT 4256 <sup>T</sup>	CIP 103.677 <sup>T</sup> (ATCC 49657 <sup>T</sup> )	Heces
		CECT 4935	LMG 13080 (ATCC 49659, cepa AS 370)	Apéndice
		CECT 4936	LMG 13081 (ATCC 49660, cepa AS 66)	Heces
		CECT 4937	LMG 13083 (ATCC 49661, cepa NMRI-208)	Heces

Especies	DHG <sup>a</sup>	Cepa no. <sup>b</sup>	Designación con la que se ha recibido. (Otro[s]) <sup>b</sup>	Fuente de aislamiento
<i>A. allosaccharophila</i>	15	CECT 4199 <sup>1e</sup>	Esteve 289 (ATCC 51208 <sup>T</sup> , LMG 14059 <sup>T</sup> )	Anguila Europea
		CECT 4200 <sup>e</sup>	Esteve 290	Anguila Europea
		CECT 4220	ATCC 35942 (CDC 0715-84)	Heces
		62	Esteve 289	Anguila Europea
		63	Esteve 290	Anguila Europea
<i>A. encheleia</i>	16	CECT 4342 <sup>Te</sup>	Esteve S181 <sup>T</sup> (ATCC51929, LMG 16330 <sup>T</sup> ).	Anguila Europea.
		CECT 4340	Esteve S177 (ATCC 51931, LMG 16328).	Anguila Europea.
		CECT 4341 <sup>e</sup>	Esteve S176 ( ATCC 51930, LMG 16329).	Anguila Europea.
		CECT 4343 <sup>e</sup>	Esteve S191 (LMG 16331).	Anguila Europea
		CECT 5026 <sup>e</sup>	LMG 16405, ( cepa KV 78)	Agua potable.
		CECT 5030	LMG 17065 (cepa AG-11)	Agua potable.
<i>A. popofii</i>	17	CECT 4995 <sup>T</sup>	LMG 17541 <sup>T</sup> ( cepa IK-O-a-10-3)	Agua potable
<i>A. enteropelogenes</i>	ND <sup>d</sup>	CECT 4487 <sup>T</sup>	DSMZ 6394 <sup>T</sup> (ATCC 49803T, LMG 12646 <sup>T</sup> )	Heces humanas
		CECT 4486 <sup>T</sup>	DSMZ 6393T (ATCC 49804T, LMG 12645 <sup>T</sup> )	Aguas

<sup>a</sup> Grupos de hibridación DNA definidos según el Centers for Disease Control (Hickmann-Brenner y cols., 2<sup>nd</sup> Int. Workshop on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Joseph y Carnahan (2000)

<sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA; CCUG, Culture Collection of the University Göteborg, Göteborg, Suecia; CDC, Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, USA.; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, España; CIP, Collection bactérienne de l'Institut Pasteur, Paris, Francia; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Institute of Chemical and Physical Research, Saitama, Japón; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Ghent, Bélgica; NCIMB, National Culture Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Escocia.

<sup>c</sup> Cepas clasificadas como *A. encheleia* por Huys y cols. (1997).

<sup>d</sup> ND, No determinado.

<sup>e</sup> Cepas examinadas por duplicado.

**Tabla n°8.** Otras cepas del género *Aeromonas* utilizadas en este estudio.

Especie	HG <sup>a</sup> .	Cepa no. <sup>b</sup>	Denominación según se recibió. (otras) <sup>b</sup>	Origen
<i>A. hydrophila</i>	ND	CECT 398	NCIMB 9233 (CDC 3077-56, LMG 3771, cepa RH-2)	Heces
		CECT 4588	Leeuwen AH290	Hombre
		7	Kodjo L4	Caracol enfermo
		8	Kodjo H14	Caracol sano
		9	Esteve A19	Anguila Europea
		10	Esteve EO63	Anguila Europea
		99	Kodjo L3	Caracol enfermo
100	Kodjo L15	Caracol enfermo		
<i>A. caviae</i>	ND	CECT 4223	ATCC 14486 (CDC 4706-61, Strain RH 1555)	Aceite emulsionado
		103	Kodjo OB3(2)	Caracol sano
		106	Kodjo L1	Caracol sano
<i>A. media</i>	ND	CECT 4234	ATCC 35950 (cepa PIE)	Piscifactoría (embalse)
<i>A. sobria</i>	ND	CECT 4248	JCM 2137 (Popoff 204)	Pescado
		CECT 4333	Esteve A13	Anguila europea
		CECT 4830	JCM 2141 (Popoff 211)	Pescado
		CECT 4833	JCM 2146 (Popoff 237)	Pescado
		CECT 4834	JCM 2366 (Popoff 202)	Pescado
		33	Esteve A21	Anguila Europea
<i>A. veronii</i> biogroupo <i>sobria</i>	8 <sup>c</sup>	CECT 4902	LMG 13693 (Altwegg 11)	Ambiental
		CECT 4903	LMG 13694 (Altwegg 27)	Desconocido
		CECT 4904	LMG 13695 (Altwegg 28)	Heces
		CECT 4906	LMG 13068 (CCUG 30357, Altwegg 64)	Heces
		CECT 4907	LMG 13069 (CCUG 30358, Altwegg 66)	Heces
		CECT 4908	CCUG 30359 (LMG 13070, Altwegg 68)	Heces
		CECT 4909	CCUG 30360 (LMG 13071, Altwegg 132)	Heces
		CECT 4910	CCUG 30361 (LMG 13072, Altwegg 151)	Heces
		CECT 4911	CCUG 30362 (LMG 13073, Altwegg 155)	Heces
		CECT 4912	CCUG 30363 (LMG 13074, CDC 0337-80, Altwegg 916)	Heces

Tabla. nº8.-(Cont.)

Especie	HG <sup>a</sup>	Cepa no. <sup>b</sup>	Denominación según se recibió. (otras) <sup>b</sup>	Origen
<i>A. jandaei</i>	ND	CECT 4335	Esteve TW9	Agua. Anguila Europea
	9 <sup>c</sup>	CECT 4814	CCUG 30351 (LMG 13066, Altwegg 950)	Heces
	9 <sup>c</sup>	CECT 4815	CCUG 30348 (LMG 13064, Altwegg 179)	Heces
	ND	24	Esteve TW9	Agua (estanque anguila)
	ND	25	Esteve TW69	Anguila Europea
	ND	26	Esteve E30	Anguila Europea
	ND	27	Esteve E44	Anguila Europea
	ND	28	Esteve E273	Anguila Europea
	ND	29	Esteve SO337	Anguila Europea
	ND	35	Esteve A26	Anguila Europea
	ND	36	Esteve AO62	Anguila Europea
	ND	37	Esteve S345	Anguila Europea
	ND	38	Esteve AO60	Anguila Europea
<i>A. veronii</i> biogroupo <i>veronii</i>	10	CECT 4816	LMG 13470 (CDC 2418-86, Altwegg 925)	Rodaballo (riñón)
		CECT 4817	LMG 13471 (CDC 2416-86 Altwegg 923)	Trucha parda (riñón)
		CECT 4818	LMG 13472 (CDC 2417-86, Altwegg 924)	Trucha arcoiris (riñón)
<i>A. schubertii</i>	12	CECT 4933	LMG 12655 (CCUG 25582)	Lesión en pierna
		CECT 4934	LMG 12668 (CCUG 25583)	Lesión en pierna
<i>A. encheleia</i>	16	CECT 4985	LMG 16398 (Altwegg 9, strain NE 59)	Hospital (ambiental)
		CECT 4986 <sup>c</sup>	LMG 16402 (Altwegg 1782, strain KV 21)	Fuente de agua potable.
		CECT 4987	LMG 17058 (strain IK-K-r-5-1)	Planta de agua potable.
		CECT 4988	LMG 17063 (strain AG 5)	Agua potable .
		CECT 5025 <sup>c</sup>	LMG 16403 (Altwegg 1783, strain KV 42)	Fuente de agua potable.
		CECT 5027	LMG 16406 (Altwegg 1786, strain KV 88)	Fuente de agua potable.
		CECT 5028	LMG 17060 (strain IK-O-c-10-2)	Planta de agua potable.
	CECT 5029	LMG 17064 (strain AG 6)	Suministro agua potable	



Tabla. nº8. (Cont.)

Especie	HG <sup>a</sup>	Cepa no. <sup>b</sup>	Denominación según se recibió. (otras) <sup>b</sup>	Origen
<i>Aeromonas</i> sp.	ND	CECT 4337	Esteve H406	Pez
		30	Esteve TW2	Aguas dulces (Piscifactoria)
		31	Esteve TW155	Aguas dulces (Piscifactoria)
		32	Esteve SA253	Anguila europea
		34	Esteve TW4	Aguas dulces (Piscifactoria)
		102	Kodjo OB1	Caracol enfermo
		104	Kodjo OB3(41)	Caracol sano
		105	Kodjo L22	Caracol sano
		123	Esteve R398	Anguila europea
		124	Esteve R399	Anguila europea
		125	Esteve R400	Anguila europea
		126	Esteve W401	Aguas dulces.
		127	Esteve H402	Anguila europea
		128	Esteve H 403	Anguila europea
		129	Esteve H404	Anguila europea
		130	Esteve H405	Anguila europea
		131	Esteve AG411	Anguila europea
		134	Esteve AG407	Anguila europea
		135	Esteve AG408	Anguila europea
		136	Esteve AG409	Anguila europea
		137	Esteve AG410	Anguila europea
		138 <sup>c</sup>	Borrás 7-76442	Espudo
		143	Fouz Aa	Agua dulce (estanque)
		146	Fouz M6	Anguila enferma. Mucus.

<sup>a</sup> Datos de porcentaje de homología que no han sido publicados o los grupos de hibridación no han sido determinados (ND), sin embargo hay grupos de hibridación (HG) que se han determinado utilizando los métodos fingerprinting (AFLP, RFLP) o quimiotaxonómicos (FAME, multilocus enzyme electroforesis).

<sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; CCUG, Culture Collection of the University Göteborg, Göteborg, Suecia; CDC, Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, USA.; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, España; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Institute of Chemical and Physical Research, Saitama, Japón; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Ghent, Belgica; NCIMB, National Culture Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Escocia.

<sup>c</sup> Cepas examinadas por duplicado.

## **1.2. Conservación y mantenimiento de las cepas.**

Los aislados originales, así como las cepas de referencia empleadas, se conservaron en forma de:

1. Cultivo fresco, en agar TSA-1 y mantenido a 10°C, una semana.
2. Glicerinado, cultivo en TSB con glicerol adicionado al 20% (v/v) y mantenido a -80°C, temperatura de congelación.
3. Liófilo, cepas bien crecidas en TSA-1, se resuspenden en solución de glucosa al 7.5% (p/v) y se liofilizan.

## **1.3. Caracterización fenotípica.**

Cada una de las cepas fue examinada para 121 caracteres fenotípicos. En general los cultivos fueron incubados a una temperatura de 28°C. La morfología celular y la tinción de Gram. (Doestch, 1981) fueron testadas después de 24 h de incubación en el medio TSA. Se utilizó además para determinar la reacción de Gram, el método del KOH (Fluharty and Packard, 1967).

La producción de pigmento marrón difusible así como la morfología colonial (colonias opacas ó translúcidas) fueron examinadas durante 7 días, tras un cultivo en TSA. La movilidad de los cultivos en Caldo triptona Soya (TSB) fue determinada por examen microscópico. Los tests de Kovacs para determinación de citocromo oxidasa, la catalasa, la reducción de nitrato y nitrito, la liquefacción de la gelatina, [método 1], la actividad reductasa y el “swarming” ó crecimiento invasivo fueron realizados según Smibert y Krieg, (1981). La sensibilidad al agente vibriostático O/129 (150µg) (Oxoid), el test de Voges-Proskauer, los tests

para lisina, glutamina y ornitina descarboxilasas (Moeller) y para arginina dihidrolasa (Moeller), los tests de halo tolerancia [0, 3, 6 % (p/v) NaCl], y la hidrólisis de arbutina y esculina fueron realizadas según lo descrito por Lee y Donovan (1985).

La actividad de la arginina dihidrolasa fue además ensayada por el método de Thornley (Thornley, 1960). La producción de gas a partir de glucosa fue ensayada en caldo glucosado, como describen Lee y cols (1981). La producción de sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) a partir de cisteína fue examinada en el medio GCF (Verón y Gasser 1963) después de 24h de incubación. La producción de indol examinada en agua de peptona suplementada con triptofano 0.5 % (w/v) (Smibert y Krieg, 1981).

El crecimiento a diferentes temperaturas se determinó en TSB después de 24 h de incubación a 37°C y 42°C, y después de 21 días a 4°C. El crecimiento a pH 4.5 y 8.5 fue ensayado en TSB después de 48 h a 28°C. El crecimiento en el medio tiosulfato-citrato-bilis (sales biliares)-sacarosa (TCBS) (Oxoid) fue examinado después de 48 h de incubación a 28°C. La utilización de citrato fue determinada en el agar citrato de Simmon's. (Oxoid).

Producción de ácido a partir de carbohidratos fue realizado en agar nutritivo (Oxoid) suplementado con púrpura de bromocresol al 0.001% (p/v) y adicionado el 1% (p/v) de los siguientes substratos (Sigma): adonitol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-amigdalina, arbutina, D-celobiosa, 2 deoxi-glucosa dulcitol, D-fructosa, galactosa, glicerol, meso-inositol, D-lactosa, D-mannitol, D-manosa, maltosa, D-melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, D-ribosa, sacarosa, salicina, D-sorbitol, L-sorbosa, D-trehalosa, D-xilosa y xilitol. Las placas fueron inoculadas utilizando un multinoculador

(Denley multipoint inoculator) e incubadas durante 48 h. Un halo de coloración amarillo alrededor del punto de crecimiento fue registrado como resultado positivo.

La hidrólisis de almidón, caseína, alginato y de Tween-80 fué realizado según lo descrito previamente por (Smibert y Krieg, 1981). Este test fue determinado después de 5-días de incubación a 28°C. La actividad sulfatasa fue determinada en TSA suplementado con lauril sulfato de sodio al 0.2% (w/v) (SDS) (Sigma), de modo similar a lo descrito por Kitaura y col (1983). El test para observación de las actividades lecitinasa y fosfatasa respectivamente fue realizado en agar TSA suplementado con yema de huevo según Janda y Bottone (1981). El test para hidrólisis de elastina (Sigma) fue realizado en el medio de Scharman modificado según lo propuesto por Hsu y cols (1981).

Las placas de todas las actividades exoenzimáticas fueron inoculadas por el sistema de múltiple inoculación (Denley-multipoint inoculator) e incubadas en un periodo de 7 días. La degradación de dichos substratos se observó por la aparición de una zona de aclaración o halo translúcido alrededor de las colonias excepto para los tests de fosfolipasa, lipasa y sulfatasa (SDS), casos en los cuáles, la hidrólisis se manifestó por la aparición de un halo opaco alrededor de las mismas. Los halos de hidrólisis correspondientes a la degradación de almidón se pusieron de manifiesto por adición de una solución de lugol. La hidrólisis de arbutina se ensayó además utilizando el método de Janda y cols (1984).

El carácter positivo de los resultados se observó a partir del tercer día de incubación, aunque las placas fueron incubadas, durante siete días para la confirmación de los resultados negativos.

La solubilidad de las colonias de *Aeromonas* en presencia de sales biliares fue determinada en cultivos sembrados en TSA, utilizando como reactivo Ácido deoxicólico (Sigma) al 2%.(p/v), pH 7.0, según lo propuesto por Hawn y Beebe (1965). El resultado considerado como positivo estuvo dado por la disgregación de las colonias al ser expuestas al ácido deoxicólico durante 30 min. a una temperatura de 37°C.

La prueba de oxidación del gluconato se realizó en cultivos de 5 días en el caldo gluconato-peptona (Haynes' broth) para lo cuál se utilizó como reactivo el "reactivo de Benedict". Así 1 ml del cultivo fue mezclado con 1ml de dicho reactivo y calentado durante 10 min. El resultado positivo fue la formación de un precipitado que oscilaba entre el amarillo y el marrón tras este tratamiento.

La utilización de diferentes substratos como única fuente de carbono y energía se realizó en el medio basal que describen Lee y cols (1981) con un 1% (p/v) de agar purificado, y suplementado con 0.2% (p/v) para los azúcares o bien 0.1% (p/v) para otros substratos. Los compuestos (Sigma) ensayados fueron: N-acetilglucosamina adenina, L-alanina,  $\gamma$ -aminobutyrate, L-arabinosa, L-arginina, L-asparagina, L-aspartato, benzoato, L-carnosina, citrato, L-citrulina, L-cisteina, L-fenilalanina, guanina, glicina, D-gluconato, D-glucosamina, L-glutamina, L-glutamato, glutatión, L-histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-leucina, L-metionina, mucato, ornitina, propionato, putrescina, L-prolina, sarcosina, L-serina, L-tirosina, L- treonina, L-triptófano, L-valina y xantina.

Las placas fueron inoculadas por el sistema de multinoculación (Denley-multipoint inoculator) e incubadas durante un período de 7 días. El resultado positivo correspondió a un crecimiento notable de la bacteria en

un substrato concreto, en comparación con el desarrollo del microorganismo en el medio control negativo. Como control positivo se utilizó el medio basal con casaminoácidos (Difco) a una concentración del 0.1% (p/v) y como control negativo, el propio medio basal sin nutrientes.

La utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía fue ensayada en el medio basal descrito por Hänninen (1994). Los compuestos se compraron a Sigma e incluyeron: acetato, trans-aconitato, citrato, fumarato, D-galacturonato, L-glicerato, glucuronato, glutarato, el DL-lactato, succinato y tartratarato. El uso de malato, maleico y malonato fue examinado en un caldo suplementado con 0.3% (p/v) de cada ácido orgánico respectivamente. Los cultivos fueron incubados durante un periodo de 4 días en agitación (200 rpm), siendo el resultado considerado como positivo cuando aparecía una coloración de verde a claramente azul.

#### **1.4. Codificación de los datos**

Los datos correspondientes a la caracterización fenotípica se codificaron como 1 (positivos), 0 (negativos) y 9 (no comparable por ausencia de dato, incapacidad de crecimiento en el medio, etc)

#### **1.5. Cálculo del error experimental.**

El error debido a la baja reproducibilidad de las pruebas rebaja el valor del coeficiente de similaridad entre cepas fenotípicamente iguales, al aumentar la dispersión de los datos. La estimación del error se ha realizado duplicando un mínimo del 10% de las cepas en estudio, y tratando los duplicados como OTU's (unidades taxonómicas operativas)

independientes (Sneath y Johnson, 1972).

Así en este trabajo se han duplicado 6 cepas, pero se obtuvieron réplicas procedentes de diferentes colecciones de cultivo para un total de 9 cepas, sumando un total de 15 cepas examinadas en duplicado (10% del total). (Tablas nº 7 y 8)

La estima del error en caso de una prueba determinada se fundamenta en la siguiente fórmula:

$$s_i^2 = d/2t$$

d= número de resultados discrepantes encontrados entre réplicas.

t= número de cepas duplicadas.

Y la probabilidad media para los resultados de las pruebas se calcula según:

$$s^2 = (s_1^2 + \dots + s_n^2) / n.$$

siendo “n” el número de pruebas realizadas:

### 1.6. Análisis numérico.

La matriz de datos se construyó con el resultado obtenido en los ensayos, salvo aquellos que procedían de los tests que aportaron un resultado uniformemente negativo o positivo. (Ver resultados y Discusión). Así la matriz de datos presentó unas dimensiones (nxt) de 71 x 153, siendo “n” el número de caracteres (pruebas seleccionadas) y “t” el número de “OTUS” (cepas).

Los datos fueron examinados con el paquete estadístico “NTSYS-pc. numerical taxonomy and multivariate analysis system”. Rolf (1998), en una computadora IBM XT 1002. Los coeficientes de similaridad

utilizados fueron “Simple Matching coefficient ( $S_{SM}$ )”, [=coeficiente de Sokal-Michener ( $S_{SM}$ )], (Sneath y Sokal, 1973); y el “coeficiente de Jaccard ( $S_J$ )”, (Jaccard, 1908).

$$\text{Sokal-Michener } (S_{SM}): \quad S_{SM} = \frac{a + d}{a + b + c + d}.$$

$$\text{Jaccard } (S_J) \quad S_J = \frac{a}{a + b + c}.$$

**a:** número de coincidencias positivas.

**b, c:** número de discordancias.

**d:** número de coincidencias negativas.

Así la evaluación de los coeficientes de similaridad para cada par de cepas se llevó a cabo mediante el programa SIMQUAL (NTSYS-pc) (Rohlf, 1998). Para el análisis de agrupamiento de la matriz de similaridad se escogió el método de asociación UPGMA, (“unweighted pair group mathematical averaging method”) que se realizó mediante el programa SAHN (NTSYS-pc) (Rohlf, 1998).

Finalmente la bondad del ajuste reflejado en el dendrograma con respecto a los datos de similaridad originales ( $S_{SM}$  ó  $S_J$ ), se valoró mediante el coeficiente de correlación existente entre la matriz de similaridad y la matriz cofenética obtenida a partir del dendrograma (UPGMA/  $S_{SM}$  ó UPGMA/  $S_J$ ). Según Rohlf (1989) se puede considerar la concordancia entre ambas matrices:

$r \geq 0.9$  excelente.

$0.9 \leq r < 0.8$  buena.

$0.8 \leq r < 0.7$  pobre.

$r \leq 0.7$  muy pobre.

Siendo “r” el coeficiente de correlación cofenética.



La matriz de valores cofenéticos se obtuvo mediante el programa COPH (NTSYS-pc) (Rohlf, 1998). Por otra parte el valor del coeficiente de correlación entre esta matriz y la matriz de similaridad original se calculó con el programa MXCOMP (NTSYS-PC) (Rohlf 1998).

### **1.7. Microscopía electrónica.**

Para nuestras observaciones de morfología, estructura celular y presencia de flagelo, utilizamos este tipo de microscopía: Microscopía electrónica de scanning ó barrido y Microscopía de transmisión de tinción negativa. En este ensayo utilizamos la cepa tipo de la especie *A.jandaei* CECT 4228<sup>T</sup>, así como las cepas CECT 4231 y CECT 4813. Las cepas fueron sembradas en el medio TSB suplementado con extracto de levadura al 0.6% (p/v), sin agitación, a 22°C, durante 24 hrs.

Microscopía electrónica de scanning ó barrido: Las células fueron filtradas, con filtros de policarbonato con poros de 0.2 µm de tamaño, (Nucleopore Corp., Pleasanton, California, ó Millipore Corporation Bedford, Mass). Se fijaron con glutaraldehído al 2,5% (v/v) en tampón fosfato 0.1M temperatura ambiente durante 2 hrs., y posteriormente con tetróxido de osmio al 1% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada durante otras 2 hrs. Tras tres lavados con agua destilada, con duración de 10 min. cada uno de ellos, las muestras se deshidrataron con etanol 5 min. en cada diferente concentración de alcohol (30, 50, 70%) y durante 20 min en etanol absoluto. Las muestras fueron secadas hasta alcanzar el punto crítico, con dióxido de carbono en el equipo de secado Tousimis Autosandri 814. Posteriormente los filtros fueron recubiertos con oro paladio (AuPd) en el equipo Bio-Rad E 5600 para ser examinados con el Microscopio de barrido de emisión de

campo: Hitachi H-4100 a 5-10 KV de potencial de aceleración. Las microfotografías se realizaron con películas Agfagan ISO 100.

Microscopía de transmisión (Tinción negativa): Se empleó el método original de Brener y Horne (1959). La suspensión de células se depositó cuidadosamente sobre una rejilla recubierta con Formvar, rejilla cubierta de carbono y se mezcló una gota de ácido fosfotúngstico (AFT) al 2% y pH 5-7 para teñir las células y se puso a secar. Se optimizó el resultado retirando parte de la gota con un papel de filtro para obtener una película de AFT más fina y hasta asegurarnos de que la preparación estuvo seca. Se observaron las células en un Microscopio electrónico de transmisión. Phillips EM 400.

## **2. Caracterización genética mediante hibridación del DNA y estudio de su composición en bases guanina y citosina.**

### **2.1. Cepas bacterianas.**

Concretamente utilizamos para el estudio genético todas las cepas agrupadas en el fenon 1 (*A.jandaei*) y también las agrupadas en los fenones 2 y 3 (*A.veronii* biogrupo *sobria*). (Tabla nº9), los cuales se relacionaban a un nivel de similaridad muy alta con el grupo “*A.jandaei*” (Ver resultados Pág. 102)

También utilizamos en este estudio genético, las cepas tipo de las especies *A.ichtiosmia*, *A.veronii* biogrupo *veronii* y la cepa de referencia del DHG 8 actualmente denominado *A.veronii* biogrupo *sobria* (Tabla nº9). Estas cepas de referencia no estaban asociadas a los fenones 1, 2 y 3 (ver resultados Pág 100), pero se emplearon como referencia por su

proximidad fenotípica o genómica con los grupos (*A.jandaei*/*A.veronii*) en estudio.

**Tabla n° 9.** Cepas incluidas en el estudio genómico (n=29)

Identificación	Fenon	Cepa
<i>A.jandaei</i>	1	CECT 4231, CECT 4229; CECT 4228 <sup>T</sup> , CECT 4901, CECT 4815; CECT 4910, CECT 4813; CECT 4838; 37, 24 <sup>a</sup> , 29, 36, 26, 32, 25,27, 38, 28, 35, 125, 31, 146
<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	CECT 4906, CECT 4911
<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	3	CECT 4902, CECT 4903
<i>A.ichtiosmia</i>	4	CECT 4486 <sup>T</sup>
<i>A.veronii</i> biogrupo <i>veronii</i>	5	CECT 4257 <sup>T</sup>
<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	7	CECT 4835

<sup>a</sup> CECT 4335=24

## 2.2. Aislamiento y purificación del DNA de las células bacterianas.

La extracción del DNA se realizó sobre sedimentos frescos de células cultivadas en caldo Agua de triptona (Triptona 1%, agua destilada, pH7.0), durante 18 hrs a una temperatura de 28°C. Se empleó el método de Marmur (1961) con las siguientes modificaciones, según la puesta a punto para las muestras de *Aeromonas*. (Esquema n°1): 1) Se efectuaron hasta tres pases de desproteinización a partir del lisado de células, antes de precipitar el DNA con etanol; 2) Se realizó una única precipitación del DNA con etanol, previamente tratado con RNAsa; 3) El tratamiento con *Rnasa* tuvo una duración de 2 horas; y 4) No se precipitó el DNA con isopropanol, después de la desproteinización llevada a cabo tras el tratamiento con *Rnasa*

Para calcular la cantidad de DNA puro extraído, el ácido nucleico se disolvió en agua desionizada, y se midió la absorbancia a

260nm de esta muestra. La concentración de DNA se calculó según la fórmula:  $A_{260nm}/20 = n_{mgr/l}$  de DNA.

Se consideró que el rendimiento en la extracción del DNA era aceptable cuando según el criterio de Marmur (1961), se obtenían entre 1000 y 2000  $\mu$ g de DNA por gramo de peso húmedo de células. La pureza del DNA extraído se valoró según los parámetros:

Absorbancia 260nm/ Absorbancia 280nm  $\geq 1,80$ .

Absorbancia 260nm/ Absorbancia 230nm  $> 2,2$ .

Absorbancia 320nm=0,01

Además también se consideró la riqueza en ácido nucleico de doble cadena de la muestra, según la curva de fusión obtenida.

**Esquema n°1:** Protocolo para extracción del DNA bacteriano.

**I OBTENCION DE MASA CELULAR**

1. Crecer la cepa bacteriana en un volumen de 1L de Agua de triptona, durante 18hrs a 25°C para obtención de un cultivo joven (fase logarítmica de crecimiento).
2. Sedimentar las células por centrifugación a 10000 rpm .10-15 min. Desechar sobrenadante.
3. Lavar las células con EDTA salino. Repetir dos veces dicha operación.
4. Pesar el “pellet” de células.

**II LISIS CELULAR (70min aprox)**

5. Resuspender el pellet de células en EDTA salino: 10 ml de EDTA-Na por gr de células.
6. Añadir lizosima (una cucharita de micro espátula ≈15 mg) e incubar 30´ en baño de Maria, a 37°C.
7. Preparar la solución de lisis: **por gr de células.**
  - 18 ml de EDTA-Na.
  - 2 ml de SDS 25%
  - 300µg de proteinasa K
  - Calentar la solución de lisis a 60°C y añadir 7,5 ml de perclorato-Na 5M.
8. Mezclar solución de células + solución de lisis. Incubar a 60°C durante 1 hora o más. Agitar ligeramente.
9. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

**III. DESPROTEINIZACIONES. (90 min. aprox.)**

**Primera desproteínización.**

10. Mezclar el lisado de células con igual volumen de Cloroformo: Alcohol isoamilico, en una “bombilla”. Agitar durante 20 min. y desgasificar repetidas veces.
11. Reposar hasta visualizar dos fases (Fase superior: DNA, Fase inferior: Proteínas).
12. Recoger la fase superior, cuidando no tomar las proteínas.

**Segunda desproteínización.**

13. Se parte de la fase superior de la primera desproteínización y se añade Cloroformo:alcohol isoamilico (v/v). Agitar durante 20 min. y desgasificar repetidas veces.
14. Reposar hasta visualizar 2 fases .
15. Recoger fase superior, cuidando de no tomar las proteínas.

**Tercera desproteínización.**

16. Repetir 13
17. Separar por centrifugación a 17000xg durante 15 min para separar dos fases.
18. Colectar fase superior (acuosa) con extremo cuidado.

**IV. PRECIPITACION DE ÁCIDOS NUCLEICOS. (60 min aprox)**

19. Colocar la fase acuosa en un tubo de plástico, a razón de volúmenes pequeños (10-15 ml).
20. Añadir etanol absoluto frío (-80°C) resbalando por las paredes del tubo.
21. Extraer las hebras de AN enrollándolas en una varilla de vidrio fina.
22. Apoyar las hebras de AN en la pared del recipiente para escurrir el exceso de alcohol.
23. Disolver las hebras de AN en un tubo que contiene 20 ml de 0.1XSSC (0.015M NaCl + 0.0015M citrato trisódico). Usar tubo de vidrio.

**Esquema nº1. (Cont.).****V. TRATAMIENTO CON RIBONUCLEASA (120 min)**

24. Añadir la ribonucleasa a una concentración final de 50µg/ml. (Para 20ml añadir 0.5ml de RNAsa) e incubar durante 2 hrs. a 37°C para degradar el RNA.

**VI. ÚLTIMA DESPROINIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE DNA (90min).**

25. Colocar la solución acuosa de DNA en una bombilla y añadir 5-10ml de Cloroformo: Alcohol isoamilico. Agitar y desgasificar durante 20min.

26. Separar las fases por centrifugación a 17000xg, 10 min.

27. Recoger fase superior.

28. Precipitar y disolver el DNA en 5-6ml de 0.1xSSC según lo dicho anteriormente (IV). Si es difícil enrollar las hebras, añadir SSC 20x a la solución acuosa (50µl/10ml).

29. Guardar el DNA en nevera durante un periodo nunca superior a un mes.

**2.3. Valoración del porcentaje G+C del DNA bacteriano.**

El porcentaje de bases guanina-citosina de los DNAs extraídos se calculó a partir del punto medio de fusión ( $T_m$ ) obtenido de la curva de fusión del DNA. (Marmur y Doty, 1962; Ferragut y Leclerc, 1976; Owen y Hill, 1979). Como referencia se tomó la  $T_m$  presentada por el DNA de la cepa *Escherichia coli* NCTC 9001, parámetro que fue determinado experimentalmente.

La curva de fusión del DNA refleja el incremento de la absorbancia (efecto hipercrómico) [ $\Delta A_{260}$  igual o superior al 40%] que tiene lugar al alterarse el “apilamiento” de las bases por la separación de las dos hebras de la molécula de DNA debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno existentes entre G-C y A-T. Los pares G-C poseen un triple enlace de hidrógeno, mientras que A-T constan de dos puentes de hidrógeno, por tanto la estabilidad de dúplex de DNA y la  $T_m$  son funciones directas del contenido en G-C.

Las muestras de DNA se disolvieron en tampón citrato-salino (SSC) 0.1x. La curva de desnaturalización térmica del DNA se obtuvo a

260nm, mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-vis551S programado para desarrollar incrementos de temperatura de 1°C/min. La  $T_m$  se determinó mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976), y el contenido G+C se calculó a partir de la  $T_m$  aplicando la ecuación de Owen y Hill (1979).

$$\mathbf{G+C= 50,9 + 2,08 (T_{mx}-T_{mp}).}$$

$T_{mx}$ :  $T_m$  del DNA estudiado

$T_{mp}$ :  $T_m$  del DNA de *E.coli* NCTC 9001<sup>T</sup>

La curva de fusión permitió además valorar la riqueza de la muestra en ácidos nucleicos de doble cadena (DNA) por la magnitud del efecto hipercrómico observado. Así cuando el incremento en la absorbancia a 260nm de la muestra era inferior al 40% se comprobó que era necesario sucesivos tratamientos con *Rnasa* para degradar ácidos nucleicos de cadena simple (ARN) y con ello purificar el DNA extraído.

#### **2.4. Hibridación DNA-DNA. (Técnica de hibridación competitiva sobre DNA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa).**

Los experimentos de hibridación DNA-DNA se prepararon según la técnica de hibridación competitiva sobre DNA inmovilizado en membranas de nitrocelulosa, según lo descrito por Jonhson (1981). Esta técnica se basa en la capacidad de la nitrocelulosa de absorber DNA de cadena simple, que posteriormente sirve como substrato para la hibridación con un DNA de cadena simple marcado radiactivamente (sonda), de tal modo que el grado de homología genética entre ambos podrá ser evaluado según la radiactividad detectada en el contador de centelleo.

En el método de hibridación competitiva, un DNA no marcado (frío) y la sonda elaborada con el mismo DNA que hay fijado al filtro,

compiten por los sitios de unión presentes en el DNA fijado. La hibridación entre la sonda (DNA marcado) y el DNA del filtro podrá ser interferida por el DNA frío siempre que entre estos exista parecido, por lo que finalmente la radiactividad retenida en la membrana será inversamente proporcional al grado de homología genética entre el DNA competidor no marcado (DNA frío) y el DNA fijado en la membrana.

#### 2.4.1. Diseño de los experimentos de hibridación.

Se prepararon cuatro experimentos de hibridación (Esquema n°2), uno encaminado a estudiar la homología genética existente entre las cepas agrupadas en el fenon 1 (*A.jandaei*). (Ver los resultados, Pág.102) y con ello confirmar su pertenencia a la especie *A.jandaei*; y otros tres para evaluar la relación genética existente entre las especies *A.jandaei*, *A.ichtiosmia* y *A.veronii* (biogrupo *sobria*), las cuáles se relacionaban a un nivel de similaridad del 82,6% S<sub>J</sub>/UPGMA (fenones 1-4; Ver Resultados Pág.100)

#### Esquema n° 2. Experimentos de hibridación.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
DNA fijado a filtro. (DNA de referencia)	<i>A.jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	<i>A.ichtiosmia</i> CECT 4486 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> CECT 4835
DNA marcado. (sonda)	<i>A.jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	<i>A.ichtiosmia</i> CECT 4486 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> CECT 4835
DNA frío competidor.(DNA)	<i>A. jandaei</i> : CECT 4248 <sup>T</sup> , CECT 4813; CECT 4229, CECT 4231, CECT 4838, CECT 4901. <i>A.ichtiosmia</i> : CECT 4486 <sup>T</sup> . <i>A.veronii</i> biogrupo <i>veronii</i> : CECT 4257 <sup>T</sup> <i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i> : CECT 4835. “ <i>A.jandaei</i> ” (fenon 1): 37, CECT 4335, 24, 29, 36, 26, 32, 25, 27, 38, CECT 4815, 28, 35, 125, CECT 4910, 31, 146. “ <i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i> ”(fenones 2y3): CECT 4906, CECT 4911, CECT 4902, CECT 4903			



### 2.4.2. Inmovilización del DNA de referencia en membrana de nitrocelulosa.

La muestra de DNA de doble cadena se desnaturalizó por calentamiento en baño a 100°C durante 10 minutos, tras lo cual se enfrió rápidamente y se añadió a 300 ml de SSC 6x muy frío. La fuerza iónica del tampón SSC junto con el enfriamiento brusco impiden la renaturalización de las hebras. Esta solución de ADN ( $A_{260}$  a  $t_0$ ) se filtró por gravedad a 4°C durante 3 horas, a través de membrana de nitrocelulosa, la cuál había sido impregnada y lavada con SSC 6x. La fijación efectiva del DNA a la membrana se evaluó midiendo la absorbancia a 260nm del flujo de salida ( $A_{260}$  a  $t_1$ ). Seguidamente la membrana se lavó de nuevo con 100ml de SSC 6x frío, midiéndose también la absorbancia del flujo de salida ( $A_{260}$  a  $t_2$ ). Las membranas se secaron en horno de vacío a 60°C durante 2 horas, y se guardaron, dentro de sobres, en desecadora a temperatura ambiente.

El % de DNA retenido en la membrana se calculó según la fórmula:

$$\frac{A_{260}(t_0) - [A_{260}(t_1) + A_{260}(t_2)]}{A_{260}(t_0)}$$

Se comprobó que el % de DNA retenido era suficiente para inmovilizar aproximadamente 25  $\mu\text{gDNA}/\text{cm}^2$ , cantidad requerida para que la hibridación sea efectiva. Para ello se aplicó el siguiente cálculo:

DNA fijado a Mb ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) = % DNA retenido x ( $\mu\text{g}$  DNA total en la solución)

---


$$A_{260}(t_0)$$

En el momento de ser utilizadas para la hibridación, a partir de la membrana se cortan porciones ovales de 9x3mm evitando los bordes, con un sacabocados. Las porciones de membrana se preincuban a la temperatura escogida para la hibridación durante 2h, en la solución de Denhart. Una vez preincubadas las pequeñas membranas se secan sobre papel de filtro y seguidamente se utilizan en los viales de hibridación.

#### **2.4.3. Marcaje radiactivo del DNA de referencia (sonda).**

Una parte del DNA homólogo al fijarlo en la membrana se marca radiactivamente con tritio ( $^3\text{H}$ ) mediante el método de “nick translation”. Se empleó el equipo (“nick translation” kit) de Amershan que incluye como dNTP marcado  $^3\text{H}$ -deoxicitidina 5'-trifosfato. (Esquema nº3).

Los DNAs radiactivos fueron fragmentados mediante repetidos pases por jeringa de 1ml (aproximadamente 10 minutos). A continuación se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C, 5 minutos y enfriamiento brusco en hielo, previamente a la hibridación.

#### **2.4.4. Preparación de los DNAs competidores. (DNA frío).**

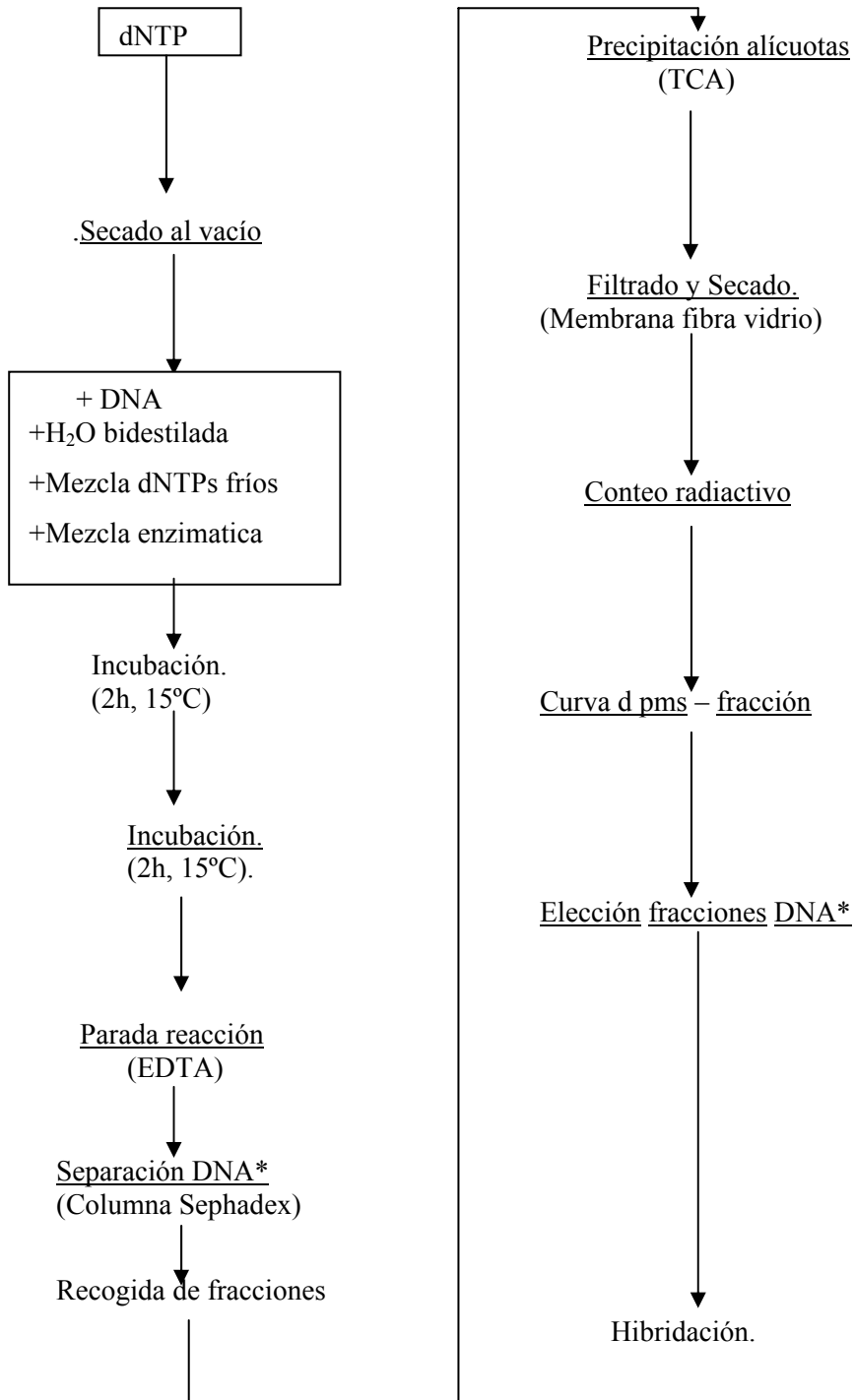
Se calculó la concentración de DNA disuelto en agua desionizada. Los DNAs se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C, 10 minutos, y enfriamiento brusco en hielo, siendo seguidamente fragmentados por sonicación. Cada muestra de DNA competidor se repartió en viales a razón de 80-110  $\mu\text{g}$  DNA/vial y éstos se liofilizaron durante un día. Las muestras de DNA competidor se guardaron hasta su uso en los experimentos de hibridación.

**2.4.5. Hibridación: Mezclas de reacción, condiciones de incubación y lavado.**

Se utilizaron como viales para la hibridación tubos de vidrio de 6 mm de diámetro y 3,5 cm de altura, provistos de tapones herméticos de goma resistente al calor. La composición de las mezclas de reacción queda indicada en la siguiente tabla:

	Hibridación sin competidor (A)	Hibridación con competidor (B)
DNA marcado	10 µl	10 µl
DNA competidor	-	50 µl (2mg/ml)
Formamida	22 µl	22 µl
Tampón	78 µl (2,82xSSC)	28 µl (7.85xSSC)
Volumen final	110 µl	110 µl
Concentración final de formamida: 20%		

**Esquema nº3.** Protocolo de marcaje radiactivo *in vitro* del DNA.



El uso de formamida permitió reducir las temperaturas de incubación que deben ser iguales a la  $T_M - 25^\circ\text{C}$ , en un factor  $0.72^\circ\text{C}$  por cada 1% de formamida añadida. Esta disminución de la temperatura de incubación reduce la cantidad de DNA desprendido de la membrana durante la incubación, que es mayor cuanto mayor es esta temperatura. Este proceso induce errores en la estimación del grado de homología, que se reducen con el empleo de la formamida. La incubación del 20% de formamida permitió reducir las temperaturas de incubación por debajo de los  $50^\circ\text{C}$ . (Esquema n° 4.)

Se prepararon cuatro tipos de series de reacción:

- 1) Mezcla A+membrana con DNA de salmón para evaluar el porcentaje de error debido a la adsorción a membrana de DNA marcado sin hibridar. Este porcentaje no suele superar el 4%.
- 2) Mezcla A+membrana con DNA problema para evaluar la cantidad de radiactividad retenida en ausencia de competidores.
- 3) Mezcla B con competidor homólogo al DNA de la membrana, para evaluar el descenso de radiactividad fijada, por comparación a 2).
- 4) Mezclas B con competidor heterólogo (DNAs de cepas tipo). Se prepararon tantas como cepas con las cuales se pretendió comparar el DNA problema.

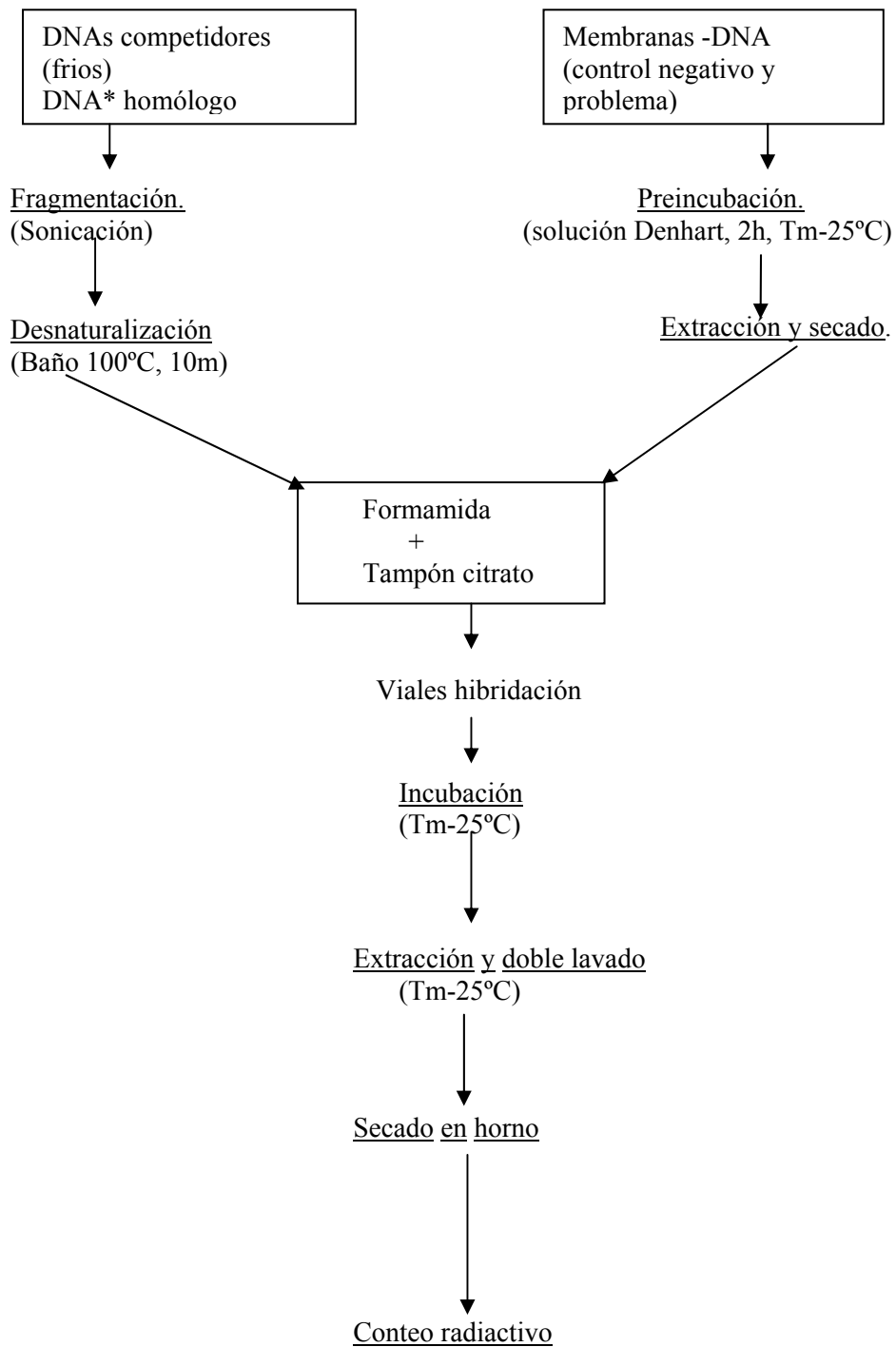
La relación de concentraciones entre DNA competidor y DNA marcado fue siempre superior a 150:1.

Los viales con su correspondiente membrana se incubaron durante 15h a la  $T_m - 25^\circ\text{C}$  (contando con la rebaja de la  $T_M$  producida por la formamida). Tras la incubación, las membranas se extrajeron

cuidadosamente de los viales y se lavaron de radiactividad no específicamente adherida en 2xSSC a la temperatura de incubación. La cámara de lavado poseía compartimentos para cada tipo de membrana, perforados de tal manera que permitieran el flujo del tampón de lavado.

Las membranas se secaron en horno a 80°C durante una noche tras la cual se midió la radiactividad retenida en ellas.

**Esquema nº4.** Protocolo de hibridación.



#### **2.4.6. Evaluación de los porcentajes de homología DNA/DNA.**

El error medio obtenido en los viales control negativo (membranas con DNA de salmón) se restó porcentualmente de los demás valores.

El cálculo del porcentaje de competencia se realizó aplicando la fórmula:

$$\%C = (x-y/x-z) \cdot 100$$

donde **x** es la radiactividad retenida sin competidor, **y**, la retenida con competidor heterólogo y **z** la retenida en presencia de competidor homólogo. (Palleroni, 1984).



## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Taxonomía numérica de las cepas de *Aeromonas*.

#### 1.1. Similaridad entre cepas duplicadas.

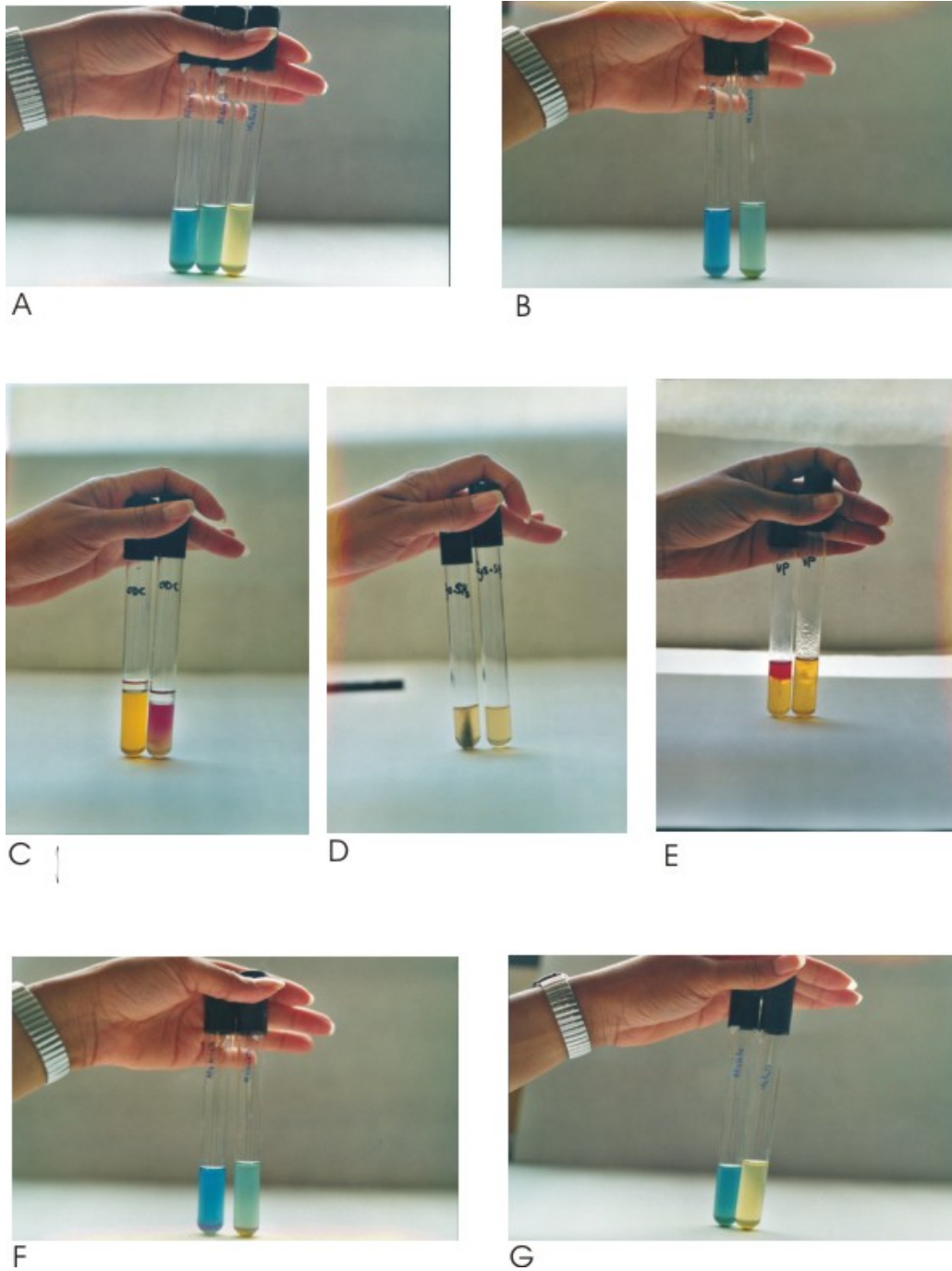
La Tabla nº10 recoge la similaridad entre las réplicas de una misma cepa. Las cepas examinadas por duplicado han mostrado una alta similaridad fenotípica, siendo los valores correspondientes a  $S_{SM}$  y  $S_J$  de (91,6-100%) y (85,3-100%) respectivamente. (Tabla nº10). Estos valores confirmaron, para el caso de duplicadas de una misma cepa obtenida a partir de diferentes colecciones, que se trataba de un mismo individuo.

Así mismo, la alta similaridad observada entre las réplicas de una misma cepa, indica la idoneidad de dichas réplicas como patrón para valorar el error metodológico cometido en el estudio fenotípico.

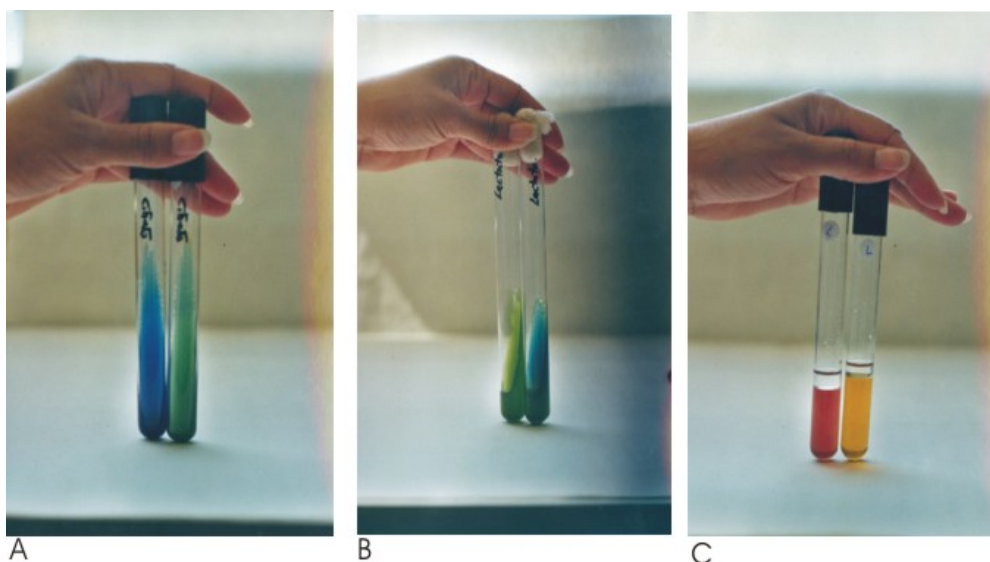
Los duplicados de la cepa tipo de *A.trota* CECT 4255<sup>T</sup> y CECT 4256<sup>T</sup>, que fueron obtenidos de diferentes colecciones de Cultivo (Tabla nº 7), presentan valores de similaridad fenotípica bajos que indicarían se trata de diferentes individuos.



**Fig. nº3** Resultados obtenidos en Agar Triptona- soya (TSA) para observación de crecimiento y producción de pigmento marrón difusible en cepas de *Aeromonas*.



**Fig. n°4.** Resultados obtenidos en pruebas fisiológico-bioquímicas para las diferentes especies y grupos de hibridación en *Aeromonas*. **A, G).** Utilización de malato, diferentes reacciones; **B, F).** Dos respuestas para utilización de malonato; **C).** Actividad ornitina descarboxilasa (ODC); **D).** Producción de  $\text{SH}_2$  a partir de cisteína; **E)** Prueba de Voges-Proskauer.



**Fig. n°5:** Resultados obtenidos en pruebas fisiológico-bioquímicas para las diferentes especies y grupos de hibridación en *Aeromonas*, **A)** utilización de citrato, **B)** lactato y **C)** presencia de lisina descarboxilasa

## 1.2. Selección de caracteres en función de su reproducibilidad.

La Tabla n°11, recoge las probabilidades medias de error, superiores a cero, de las pruebas realizadas. Varios autores (Sneath y Johnson 1972; Bryant y cols; 1986) han señalado una variación del 10% ( $s_i^2=0,01$ ) ente cepas duplicadas como límite a partir del cuál considerar baja la reproducibilidad de una prueba, y recomiendan desestimar aquellas del que  $s_i$  sea superior al 15% (0,015). En nuestro trabajo el error de las pruebas ha sido en todos los casos igual o inferior al 13% (Tabla n°11) y por ello todas las pruebas realizadas se consideraron adecuadas para el análisis.

## 1.3. Evaluación del error

El error estándar global atribuible a la baja reproducibilidad de las pruebas ha sido de un 1.2 % para un total de 121 pruebas [(n=121) y ( $S_n^2=0.012$ )]. Este valor es adecuado según lo que proponen Sneath (1972) y

Sneath y Sokal (1973) en que el parámetro debe ser inferior al 10% para que la clasificación no sea afectada.

**Tabla n°10.** Similaridad  $S_{SM}$  entre cepas duplicadas.

<b>Cepa 1= Cepa 2</b>	<b>Similaridad <math>S_{SM}</math></b>	<b>Similaridad <math>S_J</math></b>
CECT 4232 <sup>T</sup> y CECT 4233 <sup>T</sup>	0,971	0,949
CECT 4224 y CECT 4827	0,912	0,867
CECT 837 <sup>T</sup> y CECT 4257 <sup>T</sup>	0,927	0,861
CECT 4246 y CECT 4247	0,927	0,861
CECT 4258 y CECT 4258 <sup>R</sup>	1,000	1,000
CECT 4255 <sup>T</sup> y CECT 4256 <sup>T</sup>	0,731*	0,625*
62 <sup>T</sup> y CECT 4199 <sup>T</sup>	0,956	0,932
63 y CECT 4200	0,971	0,954
CECT 4342 <sup>T</sup> y 89 <sup>T</sup>	0,970	0,941
CECT 4341 y 87	0,955	0,914
CECT 4343 y 90	1,000	1,000
CECT 4335 y 24	0,956	0,927
138 y 138 <sup>R</sup>	1,000	1,000
CECT 4988 y CECT 4988 <sup>T</sup>	1,000	1,000
CECT 5025 y CECT 5025 <sup>R</sup>	0,971	0,952
CECT 5026 y CECT 5026	0,971	0,946

R, cepa replicada en este estudio.

\*, según estos valores no corresponde a la misma cepa

**Tabla n°11.** Probabilidades medias de error estimadas como  $S_i^2$ .

$S_i^2$ .	Pruebas fenotípicas
0,033	LDC (Moeller) GDC (Moeller) Hidrólisis de SDS Fosfolipasa Elastasa Crecimiento a 42°C Crecimiento en agar TCBS Producción de ácido de sacarosa Producción de ácido de trealosa Utilización de L-alanina Utilización de L-glutamina Utilización de L-treonina Utilización de propionato Utilización de ácido maleico
0,066	Requerimientos nutricionales Utilización de acetato Utilización de N-acetil-glucosamina Utilización de GABA Utilización de L-carnosina Utilización de citrato Utilización de D-gluconato Utilización de D-glucosamina Utilización de DL-glicerato Utilización de glicina
0,010	Utilización de L-arginina Utilización de succinato Utilización de L-histidina

#### 1.4. Selección de caracteres en función de su poder discriminatorio.

Los resultados de la caracterización fenotípica para todas las cepas se recogen en los Anexos.

De todos ellos, los caracteres invariantes (Tabla n°12) (uniformemente positivos o negativos, para todas las cepas) no se incluyeron en la matriz de datos por carecer de poder discriminatorio. (Sneath y Sokal, 1973).

Se eliminaron de la matriz de datos los caracteres morfológicos (A), los resultados redundantes (B), o aquellos que eran dependientes de sí la cepa procedía de un líofilo procedente de una colección, o bien era un aislado reciente (C), y con ello se redujeron las diferencias entre los análisis obtenidos con el coeficiente  $S_{SM}$ , y el coeficiente  $S_J$ :

- A. Morfología colonial.
- B. Morfología celular
- C. Arginina de Thornley
- D. Auxotrofia.

Así la matriz de datos utilizada en el análisis contenía información para 153 cepas (OTUS) y 71 caracteres fenotípicos.

### **1.5 Agrupamiento de las OTU'S mediante UPGMA.**

En la búsqueda del nivel de similaridad óptimo al cuál definir los grupos se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- El coeficiente  $S_{SM}$  rinde valores de similaridad más altos que el  $S_J$  ya que a diferencia de este último tiene en cuenta las coincidencias negativas entre las OTU'S, por lo tanto el nivel de similaridad para la definición de los grupos debe ser mayor en el análisis  $S_{SM}/UPGMA$  que en el correspondiente al  $S_J/UPGMA$ , nuestro criterio de definición de grupos se ha adecuado a los referidos en estudios taxonómicos recientes sobre el género *Aeromonas*. En los estudios realizados con el  $S_{SM}$  los niveles más habituales se sitúan entre 85 y 94%, mientras que los niveles de similaridad  $S_J$  más comunes se encuentran entre 80 85%. Baumann y cols (1971); Austin y cols (1989); Kaznowski y cols; Allen y col (1983); Kämper y Altweg (1992); Pujalte y col (1992); Esteve (1993), entre otros.

**Tabla n°12.** Caracteres invariantes para las cepas de *Aeromonas* estudiadas

Tests resultados positivos	Tests resultados negativos
Citocromo oxidasa	Producción de ácido de Adonitol      Tinción de Gram.
Catalasa	Producción de ácido de D-amigdalina      Reducción de nitritos
Reducción de nitratos	Producción de ácido de D-arabinosa      Crecimiento invasivo
Crecimiento con 0% de NaCl	Producción de ácido de 2 deoxy D-glucosa      Crecimiento con 6% de NaCl
Crecimiento a 37°C	Producción de ácido de inositol      Utilización de L-isoleucina
Crecimiento pH 8.5	Producción de ácido de Dulcitol      Utilización de L-lisina
Producción de ácido de D-ribosa	Producción de ácido de D-sorbitol      Utilización de L-fenilalanina
Actividad lecitinasa	Producción de ácido de L-sorbosa      Utilización de sarcosina
Actividad amilasa	Producción de ácido de xilitol      Utilización de malonato
	Producción de ácido de xilosa      Utilización de L-metionina
	Hidrólisis de alginato      Utilización de mucato
	Utilización de trans-aconitato      Utilización de tartrato
	Utilización de Adenina      Utilización de L-triptofano
	Utilización de L-tirosina      Utilización de D-glucuronato
	Utilización de L-valina      Utilización de glutarato
	Utilización de L-xantina      Utilización de glutatión
	Utilización de L-cisteína      Utilización de guanina
	Sensibilidad O129 (150µg)      Utilización de L-asparagina.
	Utilización de benzoato

- Evitar el agrupamiento de cepas tipo procedentes de especies distintas, ya que podríamos estar utilizando un nivel de definición referido a valores supraespecíficos.

Las cepas tipo de las especies *Aeromonas* han mostrado una semejanza en los valores de similaridad en los rangos de (50.7- 87.3%) para el  $S_{SM}$  y de

(33.3-81.5%) para  $S_J$ , siendo el mayor porcentaje de similaridad para *Aeromonas hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> y *Aeromonas bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>.

- Evitar el agrupamiento de cepas tipo procedentes de especies distintas ya que podríamos estar utilizando un nivel de definición referido a valores supraespecíficos.
- Valor de similaridad entre las cepas duplicadas: El nivel de definición de los grupos debe ser según Sneath (1972), inferior al valor mínimo de similaridad entre cepas duplicadas, sino estaríamos apreciando diversidades fenotípicas de rango intraespecífico. En nuestro caso, los valores de similaridad entre cepas duplicadas como se ha mencionado previamente han estado ubicados entre el (91.6-100%) y el (85.3-100%) para los coeficientes  $S_M$  y  $S_J$  respectivamente. (Tabla nº10).
- Los grupos formados pueden ser diferenciados por un mínimo de tres divergencias con relación a las frecuencias de respuesta en las pruebas realizadas. (Sneath, 1972).



**Tabla n°13.** Similaridad  $S_{SM}$  entre cepas Tipo y cepas de referencia de grupos de hibridación.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>A.jandaei</i> <sup>T</sup>	1.000																		
2 <i>A.sobria</i> DHG8	0.809	1.000																	
3 <i>A.veronii</i> <sup>T</sup>	0.824	0.779	1.000																
4 <i>A.sobria</i> <sup>T</sup>	0.838	0.838	0.779	1.000															
5 <i>A.trota</i> <sup>T</sup>	0.776	0.731	0.687	0.731	1.000														
6 <i>A.hydrophila</i> <sup>T</sup>	0.691	0.618	0.721	0.618	0.702	1.000													
7 <i>A.allosaccharophila</i> <sup>T</sup>	0.750	0.824	0.779	0.735	0.731	0.706	1.000												
8 <i>A.eucrenophila</i> <sup>T</sup>	0.677	0.750	0.735	0.632	0.716	0.809	0.809	1.000											
9 <i>Aeromonas pDHG11</i>	0.632	0.735	0.662	0.662	0.537	0.471	0.588	0.632	1.000										
10 <i>A.bestiarum</i> <sup>T</sup>	0.721	0.706	0.750	0.677	0.702	0.853	0.824	0.838	0.588	1.000									
11 <i>A.caviae</i> <sup>T</sup>	0.603	0.647	0.691	0.559	0.761	0.794	0.735	0.838	0.588	0.765	1.000								
12 <i>A.media</i> <sup>T</sup>	0.603	0.706	0.691	0.574	0.612	0.677	0.706	0.750	0.618	0.677	0.765	1.000							
13 <i>A.schubertii</i> <sup>T</sup>	0.779	0.706	0.662	0.735	0.702	0.618	0.618	0.603	0.588	0.677	0.612	0.529	1.000						
14 <i>Aeromonas sp HG13</i>	0.721	0.677	0.603	0.647	0.672	0.559	0.618	0.603	0.588	0.618	0.647	0.529	0.794	1.000					
15 <i>A.salmonicida</i> <sup>T</sup>	0.632	0.647	0.603	0.662	0.508	0.500	0.588	0.603	0.794	0.559	0.500	0.588	0.588	0.559	1.000				
16 <i>A.encheleia</i> <sup>T</sup>	0.677	0.779	0.735	0.721	0.627	0.632	0.750	0.765	0.750	0.750	0.691	0.662	0.662	0.662	0.691	1.000			
17 <i>A.ichtiosmia</i> <sup>T</sup>	0.853	0.868	0.824	0.779	0.716	0.662	0.809	0.706	0.632	0.750	0.632	0.662	0.691	0.691	0.574	0.574	1.000		
18 <i>A.enteropelógenes</i> <sup>T</sup>	0.836	0.791	0.746	0.821	0.818	0.582	0.731	0.657	0.612	0.612	0.612	0.612	0.702	0.657	0.627	0.627	0.746	1.000	
19 <i>A.popoffii</i>	0.882	0.809	0.735	0.882	0.687	0.603	0.662	0.647	0.662	0.662	0.515	0.574	0.750	0.632	0.662	0.662	0.824	0.776	1.000

**1.** (CECT 4228<sup>T</sup>); **2** (CECT 4835); **3** (CECT 4257<sup>T</sup>); **4** (CECT 4245<sup>T</sup>); **5** (CECT 4255<sup>TR</sup>); **6.** (CECT 839<sup>TR</sup>); **7** (CECT 4199<sup>TR</sup>); **8** (CECT 4224<sup>T</sup>); **9** (CECT 4253); **10** (CECT 4227<sup>TR</sup>); **11**(CECT 838<sup>TR</sup>); **12** (CECT 4232<sup>TR</sup>); **13** (CECT 4240<sup>T</sup>); **14** (CECT 4254); **15** (CECT 894<sup>TR</sup>); **16** (CECT 4342<sup>T</sup>); **17** (CECT 4486<sup>T</sup>); **18** (CECT 4487<sup>T</sup>); **19** (CECT 4995).

**Tabla nº14.** Similitud  $S_j$  entre cepas Tipo y cepas de referencia de grupos de hibridación.

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>A.jandaei</i> <sup>T</sup>	1.000																		
2 <i>A.sobria</i> DHG8	0.683	1.000																	
3 <i>A.veronii</i> <sup>T</sup>	0.745	0.674	1.000																
4 <i>A.sobria</i> <sup>T</sup>	0.738	0.703	0.688	1.000															
5 <i>A.trota</i> <sup>T</sup>	0.681	0.609	0.611	0.625	1.000														
6 <i>A.hydrophila</i> <sup>T</sup>	0.618	0.527	0.672	0.554	0.649	1.000													
7 <i>A.allosaccharophila</i> <sup>T</sup>	0.646	0.721	0.706	0.625	0.647	0.649	1.000												
8 <i>A.eucrenophila</i> <sup>T</sup>	0.577	0.638	0.667	0.528	0.642	0.764	0.740	1.000											
9 <i>Aeromonas pDHG11</i>	0.419	0.514	0.500	0.410	0.367	0.357	0.404	0.468	1.000										
10 <i>A.bestiarum</i> <sup>T</sup>	0.642	0.608	0.696	0.593	0.643	0.821	0.769	0.792	0.451	1.000									
11 <i>A.caviae</i> <sup>T</sup>	0.509	0.529	0.625	0.464	0.692	0.750	0.660	0.784	0.429	0.714	1.000								
12 <i>A.media</i> <sup>T</sup>	0.471	0.556	0.596	0.423	0.509	0.607	0.600	0.660	0.409	0.600	0.680	1.000							
13 <i>A.schubertii</i> <sup>T</sup>	0.651	0.535	0.549	0.591	0.538	0.536	0.490	0.491	0.349	0.585	0.509	0.385	1.000						
14 <i>Aeromonas sp HG13</i>	0.548	0.463	0.460	0.455	0.522	0.455	0.458	0.460	0.300	0.500	0.510	0.347	0.632	1.000					
15 <i>A.salmonicida</i> <sup>T</sup>	0.405	0.385	0.426	0.395	0.317	0.370	0.391	0.426	0.533	0.411	0.333	0.364	0.333	0.250	1.000				
16 <i>A.encheleia</i> <sup>T</sup>	0.532	0.634	0.633	0.578	0.510	0.554	0.638	0.667	0.553	0.667	0.588	0.521	0.500	0.465	0.462	1.000			
17 <i>A.ichtiosmia</i> <sup>T</sup>	0.762	0.769	0.745	0.659	0.612	0.584	0.717	0.608	0.419	0.673	0.537	0.531	0.593	0.512	0.341	0.600	1.000		
18 <i>A.enteropelogenes</i> <sup>T</sup>	0.718	0.632	0.630	0.676	0.721	0.491	0.600	0.531	0.350	0.509	0.490	0.447	0.524	0.439	0.359	0.467	0.595	1.000	
19 <i>A.popoffii</i>	0.795	0.667	0.625	0.778	0.563	0.518	0.531	0.529	0.425	0.566	0.411	0.420	0.595	0.419	0.410	0.511	0.707	0.615	1.000

1. (CECT 4228<sup>T</sup>); 2 (CECT 4835); 3 (CECT 4257<sup>T</sup>); 4 (CECT 4245<sup>T</sup>); 5 (CECT 4255<sup>TR</sup>); 6. (CECT 839<sup>TR</sup>); 7 (CECT 4199<sup>TR</sup>); 8 (CECT 4224<sup>T</sup>); 9 (CECT 4253); 10 (CECT 4227<sup>TR</sup>); 11(CECT 838<sup>TR</sup>); 12 (CECT 4232<sup>TR</sup>); 13 (CECT 4240<sup>T</sup>); 14 (CECT 4254); 15 (CECT 894<sup>TR</sup>); 16 (CECT 4342<sup>T</sup>); 17 (CECT 4486<sup>T</sup>); 18 (CECT 4487<sup>T</sup>); 19 (CECT 4995).

**1.6. Comparación de los resultados obtenidos con los coeficientes  $S_{SM}$  y  $S_J$ .**

En la tabla nº15 se resumen los resultados obtenidos con los coeficientes  $S_{SM}$  y  $S_J$ .

En el análisis  $S_J$ ./UPGMA, las cepas quedaron agrupadas en 22 grupos, a un nivel de definición de grupo igual o superior al 81,6%. ( $S_J$ ). (Tabla nº15, Fig. nº6)

El análisis  $S_{SM}$  /UPGMA. Rindió un dendrograma muy parecido en el que a un nivel de similaridad igual o superior al 90,1 % las cepas quedaron agrupadas en 28 grupos (Tabla nº15, Fig.nº7).En ambos análisis el porcentaje de cepas no agrupadas fue idéntico (Tabla nº15). No obstante, el dendrograma derivado del análisis  $S_J$ ./UPGMA presentó grupos más compactos en el caso de especies concretas ya que el dendrograma  $S_{SM}$ /UPGMA mostraba grupos adyacentes correspondientes a una misma especie. (Figuras nº 6 y 7. Además, el valor del coeficiente de correlación cofenética fue superior para el análisis  $S_J$ ./UPGMA. (Tabla nº 15).

**Tabla nº15.** Cuadro resumen de los resultados del análisis numérico.

	Análisis S <sub>SM</sub> /UPGMA	Análisis S <sub>J</sub> /UPGMA
Nivel de definición de grupo (%S)	90,1	81,6
Número de grupos obtenidos/	28 23	22 22
Número de fenones definidos		
Número de cepas agrupadas/	112 41	110 43
Número de cepas no agrupadas		
Cepas de referencia agrupadas	<i>A.jandaei</i> <sup>T</sup> <i>A.ichtiosmia</i> <sup>T</sup> <i>A.veronii</i> <sup>T</sup> <i>A.allosacharophila.</i> <sup>T</sup> <i>A.sobria</i> (CECT 837 <sup>T</sup> y CECT 4245 <sup>T</sup> ) <i>A.schubertii</i> <sup>T</sup> <i>A.hydrophila</i> <sup>T</sup> . <i>Acaviae.</i> <sup>T</sup> <i>A.enceleia</i> <sup>T</sup> . <i>A.eucrenophila</i> <sup>T</sup> . <i>A.media</i> <sup>T</sup> . <i>A.salmonicida</i> <sup>T</sup> . <i>A.sobria</i> DHG8 (CECT 4835)	<i>A.jandaei</i> <sup>T</sup> <i>A.ichtiosmia</i> <sup>T</sup> <i>A.veronii</i> <sup>T</sup> <i>A.allosacharophila.</i> <sup>T</sup> <i>A.sobria</i> (CECT 4245 <sup>T</sup> ) <i>A.trota.</i> <sup>T</sup> <i>A.hydrophila.</i> <sup>T</sup> <i>A.bestiarum</i> <sup>T</sup> <i>A.caviae.</i> <sup>T</sup> <i>A.enceleia</i> <sup>T</sup> . <i>A.eucrenophila</i> <sup>T</sup> . <i>A.media</i> <sup>T</sup> . <i>A.schubertii</i> <sup>T</sup> <i>A.salmonicida</i> <sup>T</sup> . <i>A.sobria</i> DHG8 (CECT 4835)

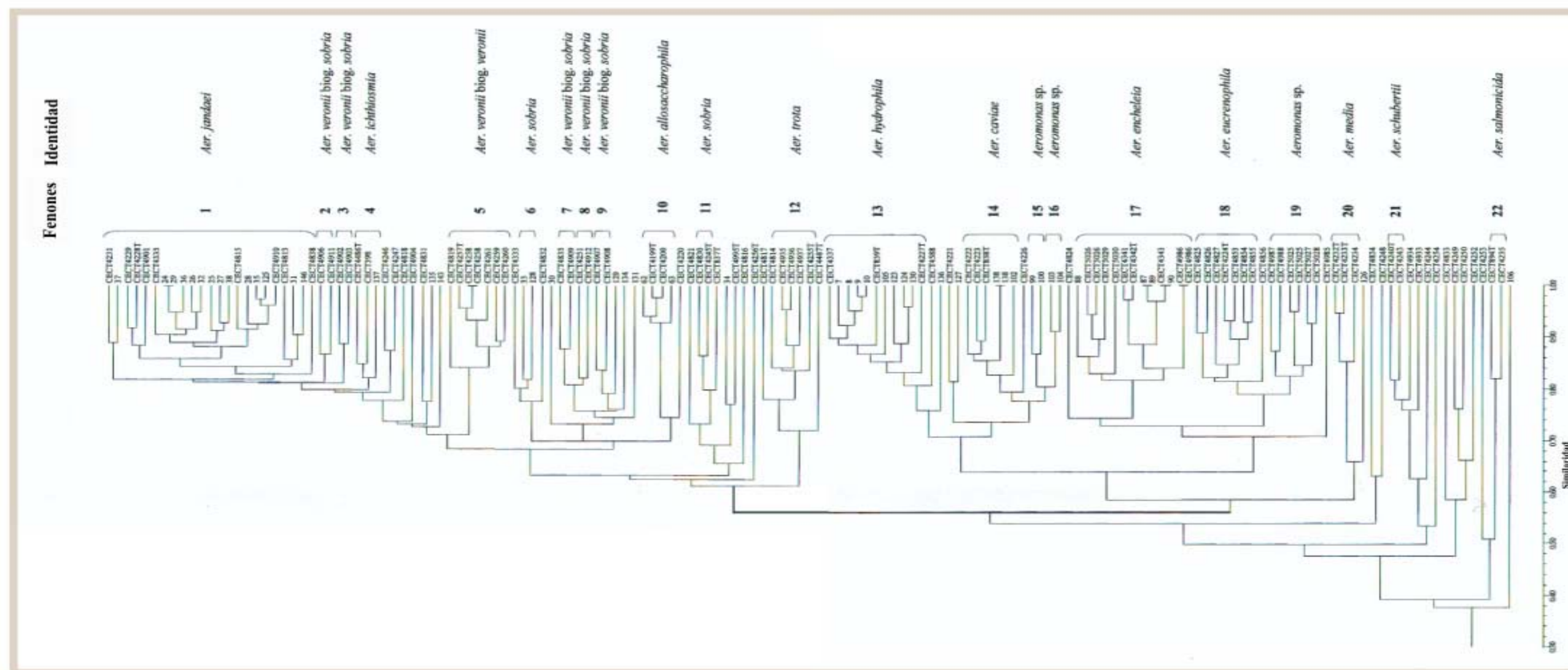
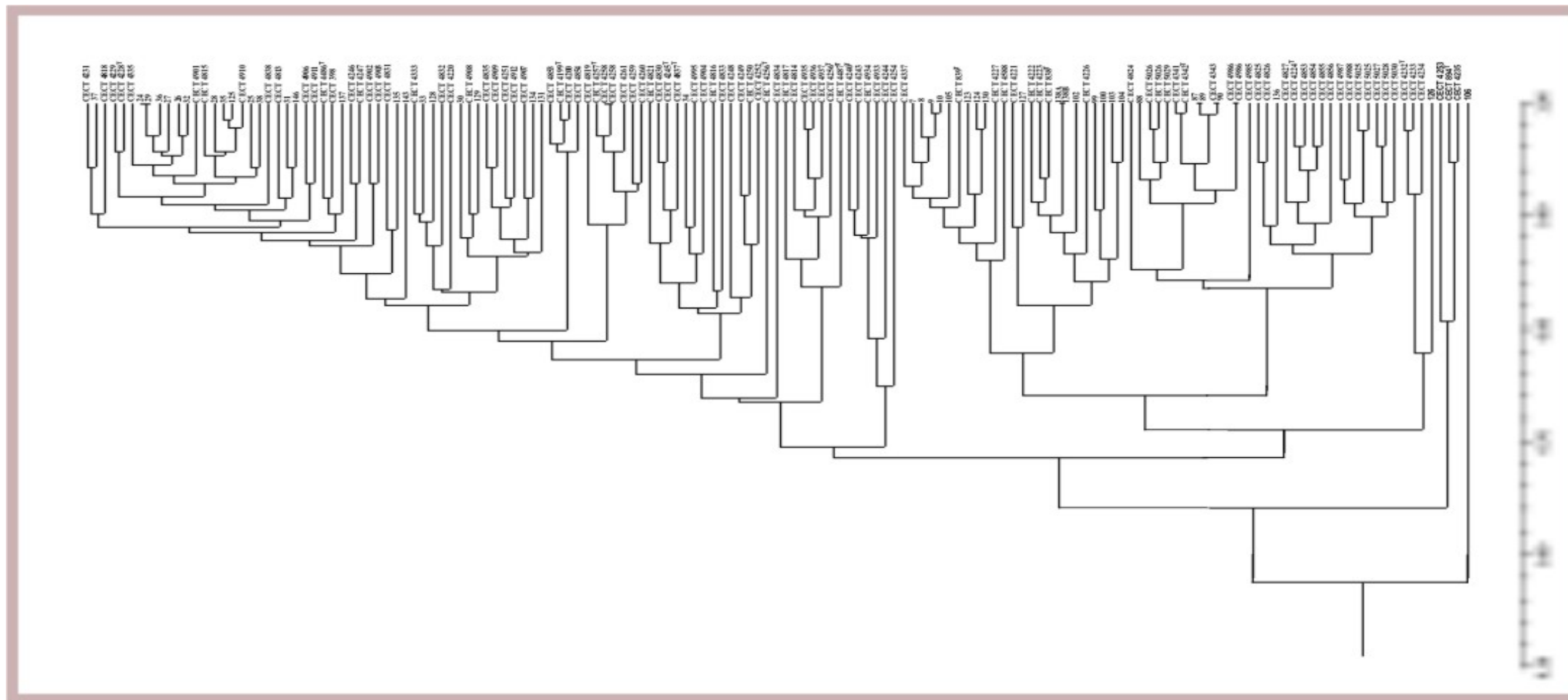


Fig. 6. Dendrograma basado en el coeficiente  $S_j$  y algoritmo UPGMA. Muestra las relaciones entre los 22 fenones obtenidos y definidos a un 81.6% de similitud S.



**Fig.7. Dendrograma basado en el coeficiente  $S_{SM}$  y algoritmo UPGMA. Muestra las relaciones entre los 28 fenones obtenidos y definidos a un 90.1 % de similitud S .**

### 1.7. Descripción de los fenones

Ya que el coeficiente  $S_j$  rindió grupos más compactos y un valor del coeficiente de correlación cofenética mayor, se escogió para definir la estructura fenética del grupo de cepas estudiadas. En la tabla nº 16 se muestran los resultados fenotípicos para cada fenon.

Los grupos 1, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 20, 21 y 22 corresponden cada uno de ellos a una única especie de *Aeromonas*, ya descrita en la actualidad.

**Fenon 1: *A. jandaei*.** Esta formado al 81.6% de similaridad e incluye cepas tipo y de referencia de la especie *A. jandaei*, cuatro cepas recibidas como *Aeromonas sp*: 31 (=Esteve TW2), 32 (=Esteve SA253), 125 (= Esteve R400) y 146 (=Fouz M6); y doce cepas identificadas como *A.jandaei* que incluyen aislados de anguila europea. (Tablas nº7 y 8; Fig. nº6). La cepa CECT 4910, que ha sido recibida como *A.veronii* biogrupo *sobria* (Tabla nº8), también quedó agrupada en grupo. (Figura nº6).

El perfil fenotípico de este grupo se corresponde con lo descrito previamente para *A.jandaei* por Carnahan y col (1991), aunque se ha encontrado discrepancias en el alto porcentaje de cepas positivas para la producción de ácido a partir de la sacarosa y la hidrólisis de elastina. (Tabla nº16).

**Fenon 4: *A.ichtiosmia*.** Este grupo se forma al 81,8% de similaridad e incluye la cepa tipo de *A.ichtiosmia* (CECT 4486<sup>T</sup>), la cepa de la CECT 398 y la 137 (=Esteve AG 410).( Tabla nº 7 y 8). Al comparar con la descripción original que dieron Schubert y col (1990a) sólo encontramos discrepancias en el resultado que se ha obtenido para la capacidad de crecer a 42°C por parte de todas las cepas del fenon 4. (Tabla nº 16).

**Tabla nº16.** Características de los fenones\* definidos por el análisis S<sub>J</sub>/UPGMA, a un nivel de similaridad del 81.6%.

Fenones	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii bio sobria</i>		<i>A.ichtismia</i>	<i>A.veronii bio veronii</i>		<i>A.veronii bio sobria</i>			<i>A.allosaccharophila</i>			<i>A.sobria</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.encheleia</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.media</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.samonitica</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Nº de cepas	23	2	2	3	7	2	2	2	2	4	2	5	11	6	2	2	13	7	6	3	2	2		
DHGs comprendidos♣	9+9+8+ND	8	8	ND	10	ND	8+8	7+8	8	15	7	14+9	1+2+ND	4+ND	ND	ND	16+16	6	16	5	12	3		
Pigmento difusible	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	50	+	+	+	+	+	50		
Producción de gas de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	50		
Resistencia O/129 (150µg)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Producción de H <sub>2</sub> S de cisteína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-		
Producción de indol	+	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
Reacción Voges Proskauer	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	91	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Oxidación del gluconato	+	+	+	+	85	-	-	-	50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
ADH (Moeller's)	+	+	+	-	+	+	+	+	50	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-		
LDC (Moeller's)	87	+	+	33	85	+	-	-	+	+	+	+	91	-	-	-	-	14	+	-	+	+		
ODC (Moeller's)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
GDC (Moeller's)	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Producción de ácido de:																								
Sacarosa	70	+	+	+	85	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	54	29	17	+	-	-		
L-Arabinosa	-	-	50	-	-	50	-	50	50	+	-	-	+	+	+	+	8	+	+	+	-	-		
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	82	33	+	50	+	86	+	-	-	-		
D-celobiosa	17	+	+	33	85	+	+	+	-	+	+	+	-	+	50	+	8	71	-	+	-	-		
Lactosa	-	50	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	+	-	-		
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	9	-	-	-	85	14	50	-	-	-		
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	83	+	-	+		



Tabla n° 16. (Cont)

Fenones	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii bio sobria</i>		<i>A.ichtismia</i>	<i>A.veronii bio veronii</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.veronii bio sobria</i>			<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.enceleita</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.media</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.samonicida</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
N° de cepas	23	2	2	3	7	2	2	2	2	4	2	5	11	6	2	2	13	7	6	3	2	2
DHGs comprendidos♣	<b>9+9+8+ND</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>ND</b>	<b>10</b>	<b>ND</b>	<b>8+8</b>	<b>7+8</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>14+9</b>	<b>1+2+ND</b>	<b>4+ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>16+16</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>3</b>
Producción de ácido de																						
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	50	+	+	+	+	+	17	-	-	-	-	+	+	-	-
Maltosa	87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	91	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-manosa	+	+	+	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	-	-	+	+	+	+	+	-
D-trealosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	50
Crecimiento a/en pH 4,5	30	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-	40	36	17	-	-	-	-	-	-	-	-
4°C	96	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40	+	+	50	-	+	+	+	+	50	+
42°C	+	50	-	+	85	+	-	-	-	+	-	60	36	86	+	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	-	+	+	60	+	+	8	29	17	33	+	-
Sales biliares	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	-	60	-	17	-	50	-	-	33	-	-	-
Hidrólisis de Arbutina♣	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Esculina	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	83	+	+	+	86	+	+	-	+
Elastina	87	50	+	33	71	-	-	-	-	-	-	-	+	67	50	-	8	43	50	-	+	+
SDS	61	-	+	-	+	-	-	-	-	-	50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Albúmina de huevo	96	+	+	+	+	50	+	+	+	75	+	-	91	83	+	-	+	86	+	-	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	50	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	50	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	83	+	+	+

Tabla n°16. (Cont)

Fenones	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii bio sobria</i>		<i>A.ichtosmia</i>	<i>A.veronii bio veronii</i>		<i>A.veronii bio sobria</i>			<i>A.allosaccharophila</i>			<i>A.sobria</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.enceleia</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A.media</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.samonica</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Nº de cepas	23	2	2	3	7	2	2	2	2	4	2	5	11	6	2	2	13	7	6	3	2	2		
DHGs comprendidos♣	<b>9+9+8+ND</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>ND</b>	<b>10</b>	<b>ND</b>	<b>8+8</b>	<b>7+8</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>14+9</b>	<b>1+2+ND</b>	<b>4+ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>16+16</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>3</b>		
Utilización de:																								
L-arabinosa	-	-	-	-	14	-	-	-	-	+	-	-	82	+	+	+	8	+	+	+	-	-		
L-histidina	48	-	50	67	+	-	-	-	-	+	-	-	73	+	+	+	92	+	+	+	-	-		
L-arginina	-	-	-	-	14	-	-	-	-	+	-	80	73	+	+	+	23	+	-	-	+	-		
L-serina	91	+	+	+	85	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
Treonina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	82	+	+	+	-	86	83	+	50	-		
L-alanina	-	-	50	-	57	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	71	-	33	-	-		
L-glutamina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	80	+	+	+	+	15	+	+	+	50	-		
Glicina	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	+	82	+	+	+	-	57	17	+	-	-			
L-prolina	96	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
L-leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	+	-	-	-	-	-			
L-citrulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-			
Utilización de:																								
Putrescina	4	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	+	+	+	+	+	-	29	-	-	+	-		
Glucosamina	91	+	+	+	+	50	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	85	+	+	+	+	-		
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	77	+	+	+	+	-		
L-malato	+	+	+	33	85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	67	-	+	+		
Maleico	-	-	-	-	29	-	50	-	50	-	+	20	18	67	50	50	92	14	67	-	+	-		
Acetato	78	-	+	67	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	85	86	67	67	+	50		
L-lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	91	83	+	+	-	-	-	+	+	-		
Citrato	83	+	+	33	85	+	-	50	+	25	50	+	55	83	+	+	-	-	-	33	+	-		

Tabla n°16. (Cont).

Fenones	<i>A. jandaei</i>	<i>A. veronii bio sobria</i>		<i>A. ichtiosmia</i>	<i>A. veronii bio veronii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii bio sobria</i>		<i>A. allosaccharophila</i>			<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>A. media</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. samoniciida</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Nº de cepas	23	2	2	3	7	2	2	2	2	4	2	5	11	6	2	2	13	7	6	3	2	2	
DHG's comprendidos♣	9+9+8+ND	8	8	ND	10	ND	8+8	7+8	8	15	7	14+9	1+2+ND	4+ND	ND	ND	16+16	6	16	5	12	3	
Utilización de:																							
Propionato	-	-	50	-	-	50	-	-	-	-	40	64	17	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-glicerato	26	-	-	+	-	-	-	-	-	-	40	-	-	50	-	38	-	50	-	50	-	-	-
Fumarato	+	+	+	+	85	+	+	+	+	+	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Succinato	96	+	+	+	85	+	+	50	+	75	-	+	+	+	+	+	+	+	+	67	50	-	-
GABA	-	-	-	-	-	50	-	-	-	+	-	80	82	+	+	+	8	86	17	33	-	-	-
L-aspartato	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	-	+	+	-	-	-	33	-	-	-
L-glutamato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	80	91	+	+	+	46	+	+	+	+	+	-
D-gluconato	96	+	+	+	+	+	50	+	+	+	-	+	+	+	+	+	62	86	+	+	50	+	+

\*Indica los porcentajes de resultados: +, Todas las cepas con resultados positivos; -, Todas las cepas con resultados negativos; Los números indican el porcentaje de cepas con resultados positivos. Todas las cepas agrupadas dan respuestas positivas a: producción de ácido a partir de glucosa y frutosa, crecen en NaCl al 3%. Dan resultados negativos para: producción de ácido a partir de D-melibiosa y D-rafinosa; utilizan L-ornitina, carnosina y galacturonato

♣ Composición de los grupos de hibridación: los números en negritas indican los HG obtenidos mediante hibridación DNA-DNA, los números restantes indican los HG determinados por otros métodos.

♣ Todas las cepas agrupadas, muestran la misma respuesta a la producción de ácido a partir de arbutina.

ID, identificación; DHG., grupo de homología DNA; ND, no determinado; SDS, dodecil sulfato de sodio; GABA,  $\gamma$ -aminobutirato.

**Fenon 5: *A.veronii*** biogrupo *veronii* Este grupo está formado al 83.8% e incluye sólo cepas de referencia de *A.veronii* (Tabla nº7) así como una duplicada. Las cepas CECT 4816, CECT 4817 y CECT 4818 que han sido previamente identificadas como *A.veronii* biogrupo *veronii* por Kampfer y Altwegg (1990), no han quedado incluidas en este grupo.(Tabla nº 8; Fig. nº6)

**Fenon 10: *A.allosaccharophila***. Esta formado al 92,8% de similaridad y sólo incluye las cepas tipo y de referencia de *A.allosaccharophila* (CECT 4199<sup>T</sup>, CECT 4200 y sus dos réplicas (Tabla nº7, Fig.nº6). La tercera cepa de referencia de *A.allosacharohila* (CECT 4220) se encuentra anexa a este grupo a un 73,9% de similaridad. El perfil fenotípico de este grupo es idéntico a lo descrito previamente por Martínez-Murcia y cols (1992) y Esteve (1995), y lo único discrepante es el porcentaje elevado de respuestas positivas obtenidas en los tests de utilización de L-serina y  $\gamma$ -aminobutirato (Tabla nº16), reportado en sus orígenes como resultados negativos.

**Fenon 11: *A.sobria***. Este grupo se forma al 86,2% de similaridad e incluye la cepa de la especie *A.sobria* CECT 4245<sup>T</sup> y la cepa de referencia CECT 4830 (Tablas nº 7 y 8; Fig. nº6). La otra réplica del tipo, la cepa CECT 837<sup>T</sup>, se une a este grupo a un nivel de similaridad del 79,4%. No obstante la mayor parte de las cepas asignadas por Popoff y cols (1981) a la especie *A.sobria* DHG 7, las cuales han sido caracterizadas en nuestro trabajo (Tablas nº 7 y 8), han permanecido como cepas no agrupadas (Fig. nº7). Las características fenotípicas del fenon 11 (Tabla nº 16) concuerdan

plenamente con lo descrito por Popoff (1984) para la especie *A.sobria*, así el fenon 11 representaría el núcleo de la especie *A.sobria*.

**Fenon 12: *A.trota*.** Está formado al 83,5% de similaridad e incluye todas las cepas tipo y de referencia correspondientes a la especie *A.trota* salvo la CECT 4256<sup>T</sup> y además la cepa CECT 4814 la cuál había sido previamente asignada a la especie *A.jandaei*, según Kämpfer y Altwegg (1990). (Tablas nº7 y 8; Fig. nº6). Anexas al fenon aparecen también dos cepas que se unen a este grupo, a un porciento de similaridad de 77,6% y 71,3% respectivamente y se corresponden a las cepas CECT 4817 y la cepa tipo de *A.enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup> (Tablas 7y 8; Fig nº6).

**Fenon 13: *A.hydrophila*.** Este grupo, formado al 83,2% de similaridad incluye dos cepas tipo (*A.hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> y *A.bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>), muestra cuatro cepas previamente identificadas como *A.hydrophila* (Esteve 1995; Kodjo y cols 1997) y cinco cepas recibidas como *Aeromonas* sp (CECT 4337, 105, 123, 124 y 130). (Tablas nº 7 y 8; Fig. nº6). Las características fenotípicas de este grupo se han correspondido satisfactoriamente con lo que describiese Popoff (1984), para *A.hydrophila*, sin embargo la cepa tipo de *A.bestiarum* muestra una respuesta típica en los tests propuestos por Ali y cols (1996) para la separación a nivel bioquímico de las especies *A.hydrophila* y *A.bestiarum*. Así de todas las cepas agrupadas en este fenon, la única que ha resultado ser positiva para la producción de ácido a partir de L-ramnosa pero negativa para la utilización de L-lactato, ha sido la cepa *A.bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>. (Tabla nº 16).

**Fenon 14: *A.caviae*.** Este está formado al 82,6% de similaridad e incluye la mayoría de las cepas de referencia *A. caviae*, la cepa (CECT 838<sup>T</sup>

,CECT 4222 y la CECT 4223) más los aislados 102 y 138. (Tablas nº 7y8; Fig. nº6). La cepa de referencia de *A.caviae* CECT 4226 aunque no queda agrupada se anexa, como grupo a este fenon, a un nivel de similaridad del 79,5 % (Tablas nº 7 y 8; Fig nº6). El perfil fenotipico originalmente descrito por Popoff (1984) para *A.caviae*, no se corresponde con lo que se ha obtenido en nuestros resultados siendo la única discrepancia, el bajo porcentaje de cepas positivas respecto a la producción de ácido a partir de salicina.(Tabla nº16).

**Fenon 17: *A.enceleia*.** El grupo se ha formado a un 81,6% de similaridad e incluye las cepas originalmente asignadas a la especie *A.enceleia* por Esteve y col (1995). (CECT 4342<sup>T</sup>, CECT 4341, CECT 4343, S177 y sus réplicas, además de algunas de las cepas clasificadas como *A.enceleia*, por Huys y cols (1997) como la CECT 4986, CECT 5026, la CECT 5029y CECT 5030. (Tablas nº 7 y 8, Fig. nº6). El perfil fenotipico de este fenon se corresponde exactamente con la descripción original dada por Esteve y col (1995), exceptuando los resultados obtenidos para la utilización de la L-glutamina (15%), L-arginina (23%), y el D-gluconato (62%), (Tabla nº7), los cuales originalmente se describieron como caracteres negativos. Sin embargo nuestros resultados discrepan notablemente con lo que reportan Huys y cols (1997b) en su extensión de la descripción de *A.enceleia*, ya que el fenon 17 se ha caracterizado en general por ser incapaz de producir ácido a partir de glicerol (0%), ni de utilizar L-glutamina, (15%) o  $\gamma$ -aminobutirato (8%), (Tabla nº 16) habiendo sido descritas por Huys y cols (1997b) como caracteres uniformemente positivos para *A.enceleia*. En la descripción original de Esteve y cols (1995b), todos estos caracteres son negativos para *A.enceleia*.

**Fenon 18: *A.eucrenophila*.** Este grupo se forma al 82,3% de similitud e incluye la mayoría de las cepas originalmente asignadas a la especie *A.eucrenophila* por Schubert y Hegazi (1988). (CECT 4224<sup>T</sup>, CECT 4825, CECT 4826, CECT 4827, CECT 4853, CECT 4854 y CECT 4855) (Tabla nº7, Fig nº6). Así la composición en cepas del fenon 18 está de acuerdo con la propuesta original de Schubert y Hegazi (1988) pero no con la propuesta de Huys y cols (1977b) tal y como se muestra en la descripción enmendada de la especie *A.eucrenophila*. (Huys y cols 1997b)

Es más este grupo, muestra las características fenotípicas descritas originalmente por Schubert y Hegazi (1988) para la especie de *A.eucrenophila*, pero estas discrepan de lo descrito en la propuesta más actual dada por Huys y cols (1997b). Estas discrepancias con la descripción extendida publicada por Huys y cols (1997b) fueron el bajo porcentaje de cepas positivas para la producción de ácido a partir de lactosa y glicerol (0%) y para la utilización de L-aspartato (0%) y de putrescina (29%) (Tabla nº 16) caracteres propuestos como uniformemente positivos por Huys y cols (1997b). Por otra parte, hemos observado un alto porcentaje de cepas positivas en la utilización de L-alanina (71%), (Tabla nº 16) y este carácter se ha propuesto como negativo por Huys y cols (1997b)

La cepa CECT 4856 (Tabla nº7) originalmente asignada por Altwegg y cols (1991) al grupo de hibridación 11 (DHG 11) y recientemente incluida por Huys y cols (1997b), en la especie *A.encheleia*, ha quedado anexa a este fenon 18, al que se une a un nivel de similitud del 81,4%. (Fig nº6). Por otra parte, la cepa CECT 4253 (Tabla nº7), cepa de referencia de la genespecie DHG 11 y posteriormente incluida en la especie *A.encheleia* por Huys y cols (1997b) no ha quedado de ningún modo

emparentada o relacionada con las especies *A.eucrenophila*, ni *A.encheleia*. (Fig nº6).

**Fenon 20: *A.media*.** Este grupo se forma al 85,2% de similaridad e incluye la cepa tipo de la especie (CECT 4232<sup>T</sup>) y su réplica , además de la cepa CECT 4234, (Tablas nº7 y 8, Fig nº6). Estas cepas han producido ácido a partir de sacarosa, D-celobiosa y D-trehalosa (Tabla nº16), resultado que contrasta con los datos publicados por Allen y col (1983), quien afirma que la especie *A.media* es incapaz de utilizar dichos azúcares.

**Fenon 21: *A.schubertii*.** Este grupo se forma al 81,6% de similaridad e incluye las cepas de referencia CECT 4240<sup>T</sup> y la CECT 4243 (Tabla nº7). No han quedado incluidas en el grupo las cepas CECT 4244, CECT 4933 ni la CECT 4934 (Tablas nº 7y 8), éstas se han ido uniendo al fenon 21 a un nivel de similaridad del 62,7 al 77,9%. (Fig nº6).

**Fenon 22: *A.salmonicida subsp.salmonicida*.** Este grupo se forma al 81,8% de similaridad y agrupa sólo las dos cepas de referencia para esta especie. Las características fenotípicas del fenon 22 (Tabla nº16) se corresponden con lo descrito originalmente por Popoff (1984) para *A.salmonicida subsp salmonicida*, con la excepción de que los caracteres de utilización y/o producción de ácido a partir de sacarosa han sido negativos. Ninguna de ellas ha dado una respuesta positiva a la utilización y producción de ácido.

Las características fenotípicas de los grupos 2, 3, 6, 7, 8 y 9 se corresponden satisfactoriamente con el perfil descrito para la especie



*A.sobria*, por Popoff (1984), o sea: son móviles, producen gas de glucosa, sulfhídrico a partir de cisteína, indol, ácido de sacarosa y de manitol además de crecer a 37°C. No producen pigmento marrón difusible, ni ácido de salicina, no hidrolizan esculina y no utilizan L-arabinosa, L-histidina, ni L-arginina. (Tabla nº16). No obstante estos grupos mayoritariamente agrupan cepas de referencia recibidas como pertenecientes a *A.veronii* biogrupo *sobria*, taxon anteriormente denominado *A.sobria* DHG 8. (Tablas 7 y 8; Fig nº6)

Así, en el Fenon **2** han quedado agrupadas las cepas CECT 4906 y CECT 4911; en el Fenon **3** las cepas CECT 4902 y CECT 4903); Fenon **7** incluye las cepas CECT 4835 y CECT 4909; el Fenon **8** las cepas CECT 425 y CECT 4912; y finalmente el Fenon **9** agrupa las cepas CECT 4907 y CECT 4908.(Fig. nº 6). Por otra parte el Fenon **6** incluye dos aislamientos de **Anguila europea** (33, 128) (Tabla nº8).

Los fenones 2 y 3 estuvieron próximos en el agrupamiento a la cepa CECT 4246 (4247) la cuál ha sido utilizada habitualmente como cepa de referencia del grupo de hibridación ocho (DHG 8) (Fig nº 6). No obstante la verdadera cepa de referencia del DHG 8, es decir la cepa de Popoff 224 (=CECT 4835) estuvo próxima en el dendrograma a los fenones 7, 8 y 9 (Fig nº6). Las características fenotípicas presentadas por estos tres fenones fueron algo distintas a las descritas para *A.veronii* biogrupo *sobria* dado que mostraron una respuesta negativa a la prueba de Voges-Proskauer, (Tabla nº16) la cual sería positiva para *A.veronii* biogrupo *sobria* según otros autores (Joseph y cols 1991; Carnahan y Joseph 1993; Huys y cols 2001). No obstante la cepa CECT 4835 también fue negativa para la prueba Voges-Proskauer.

Finalmente los grupos 15, 16 y 17 podrían corresponder a nuevas especies de *Aeromonas* debido a sus peculiares características fenotípicas:

Fenones **15** y **16**: *Aeromonas sp.* Estos grupos se han formado a un 86,8% y a un 91,1% de similaridad, respectivamente. El fenon 15 incluye los aislamientos 99 y 100. El fenon 16 agrupa las cepas 103 y 104 (Fig n°6). Estas cuatro cepas han sido identificadas como *A. hydrophila* / *A. caviae* por Kodjo y cols. (1997). (Tabla n°8). No obstante, el perfil fenotípico de estos fenones (Tabla n°16) fue diferente de lo descrito para las especies de *Aeromonas* móviles y positivas para ADH y salicina actualmente reconocidas (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia* y *A. bestiarum*).

Fenon **19**: *Aeromonas sp.* Este grupo se ha formado a un 82,5% de similaridad e incluye cinco cepas identificadas previamente como *A. encheleia* por Huys y colaboradores en 1997 (CECT 4987, CECT 4988, CECT 5025, la CECT 5027 y CECT 5028) (Tabla n°8, Fig n°6). Estas cepas habían sido ubicadas en la especie *A. encheleia* en base a datos fenotípicos y moleculares (RFLP/AFLP). (Huys y cols 1997 b). Nuestro estudio sin embargo, deja claramente visible que las cepas agrupadas en el fenon 19 quedan separadas con respecto a las cepas de referencia de la especie *A. encheleia*, que quedan situadas en el Fenon **17** (Fig. n°6).

Las diferencias fenotípicas que hemos encontrado entre los Fenones 17 y 19 son notables, (Tabla n°16). Así la producción de ácido de L-arabinosa, y el uso como fuente de carbono y energía de L-arabinosa, treonina y L-glutamina, son positivos para el Fenon 19, pero mayoritariamente negativos para el Fenon 17. (Tabla n°16). Originalmente

la producción de ácido de L-arabinosa fue propuesta prueba diferencial para la identificación de la especie *A. encheleia* por Esteve y cols (1995c) pero este carácter no ha sido incluido en la descripción extendida de la especie Huys y cols (1997b).

Hemos encontrado una distancia fenotípica muy corta entre los Fenones **18** (*A. eucrenophila*) y **19** (Fig nº6), no obstante el fenon 19 no cumple el perfil fenotípico descrito para la especie *A. eucrenophila*. Así el fenon 19 fué negativo para la producción de ácido a partir de D-celobiosa, y para el uso de L-arginina, ambos caracteres son uniformemente positivos para la especie *A. eucrenophila*. (Tabla nº16).

### **1.8. Composición genotípica de los fenones.**

La Tabla nº17 muestra, donde es conocido, los grupos de homología DNA-DNA a los que pertenecen las cepas agrupadas en cada fenon. Muchos fenones son genéticamente homogéneos ya que incluyen cepas pertenecientes a un solo grupo de hibridación. Así los fenones 5, 10, 14, 17, 18 y 21, agrupan respectivamente cepas tipo y de referencia clasificadas por otros autores mediante los métodos tradicionales de hibridación DNA-DNA (Popoff y cols 1981; Hickman-Brenner y cols. 1987; Hickman-Brenner y cols. 1988; Schubert y Hegazi 1988; Esteve y cols. 1995a,b; Valera y cols, 2002). Además, los fenones 2, 3, 7 y 9 agrupan las cepas que han sido asignadas al DHG 8 (Popoff y cols.1981; Altwegg y cols. 1990). Las pocas cepas que representan al DHG 7 (Popoff y cols.1981) están agrupadas en el fenon 11.

Muchas de las cepas incluidas en el fenon 1 pertenecen al DHG 9 (Carnahan, Fanning, y Joseph, 1991) excepto la cepa CECT 4910, que fué recibida como cepa de referencia del DHG 8. No obstante los datos de

hibridación DNA-DNA para la CECT 4910, nunca han sido publicados. Un caso similar ha sido lo sucedido con la clasificación de la cepa CECT 4814. Esta fue recibida como referencia de *A.jandaei* DHG 9 (Tabla nº8), si bien su asignación al grupo de hibridación 9 está basada en métodos moleculares (Huys y cols 1999) ya que no se han publicado datos de homología DNA-DNA para esta cepa. Como puede apreciarse en la Fig nº6 la cepa CECT 4814 quedó agrupada en el fenon 12 que corresponde a *A.schubertii*.

Sólo el fenon 13 incluye cepas que pertenecen a diferentes DHGs (Tabla nº 17), como *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> y *A.bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>, las cuales han sido respectivamente asignadas a los DHG1 y DHG2 (Popoff y cols.1981; Ali y cols.1996).

#### **1.9. Caracteres diferenciales:**

La dificultad de identificar las especies de *Aeromonas* actualmente reconocidas es un problema destacado por todos los autores que han trabajado con este género.

**Tabla nº17.** Composición genotípica de los fenones (Análisis S<sub>J</sub>/UPGMA)

Fenon	Identificación	Nº de cepas agrupadas	% cepas pertenecientes a un mismo grupo de hibridación.
1	<i>A.jandaei</i>	23	26,1% (DHG9) 4,3% (DHG9) 4,3% (DHG8) 65,3% (ND)
2	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	100% (DHG8)
3	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	100% (DHG8)
4	<i>A.ichtiosmia</i>	3	100% (ND)
5	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>veronii</i>	7	100% (DHG10)
6	<i>A.sobria</i>	2	100% (ND)
7	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	50% (DHG8) 50% (DHG8)
8	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	50% (DHG7) 50% (DHG8)
9	<i>A.veronii</i> biogrupo <i>sobria</i>	2	100% (DHG8)
10	<i>A.allosaccharophila</i>	4	100% (DHG 15)
11	<i>A.sobria</i>	2	50% (DHG7) 50% (ND)
12	<i>A.trota</i>	5	80% (DHG14) 20% (DHG9)
13	<i>A.hydrophila</i>	11	9,1% (DHG1) 9,1%(DHG 2) 81,8% (ND)
14	<i>A.caviae</i>	6	33,3% (DHG4) 66,7% (ND)
15	<i>Aeromonas sp</i>	2	100% (ND)
16	<i>Aeromonas sp</i>	2	100% (ND)
17	<i>A.enceleia</i>	13	76,9% (DHG16) 23,1 (DHG16)
18	<i>A.eucrenophila</i>	7	100% (DHG6)
19	<i>Aeromonas sp</i>	6	100% (DHG16)
20	<i>A.media</i>	3	66,7% (DHG5) 33,3 (ND)
21	<i>A.schubertii</i>	2	100% (DHG12)
22	<i>A.salmonicida</i>	2	100% (DHG3)

DHG, grupode homología DNA según datos de hibridación DNA-DNA.

DHG, grupo de homología DNA según datos moleculares o quimiotaxonómicos.

ND, No determinado

**Tabla n°18.** Caracteres con valor diagnóstico para la identificación de las especies de *Aeromonas*.

	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.ichitiosmia</i>	<i>A.veronii biog. Veroni</i>	<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.encheleia</i>	<i>A.eucrenophil3a</i>	<i>A.media</i>	<i>A.chubertii</i>	<i>A.salmonicida ssp.salmonicida</i>
	DHG 9	DHG 8	DHG 8	DHG 7		DHG 10	DHG 15	DHG 14	DHG 1	DHG 4	DHG 16	DHG 6	DHG 5	DHG 12	DHG 3
	<b>1</b>	<b>2+3</b>	<b>7+8+9</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
Fenones♣															
Nº Cepas	23	4	6	2	3	7	4	5	11	6	13	7	3	2	2
Pigmento marrón difusible	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	50
Gas de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	50
H <sub>2</sub> S de cisteína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Indol	+	v+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Oxidación de gluconato	+	+	-	50	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Voges-Proskauer	+	+	-		+	+		-	+	-	-		-	+	-
ADH (Moeller's)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
LDC (Moeller's)	+	+	33	+	33	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
ODC (Moeller's)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido de sacarosa	v+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	54	v-	+	-	-
L-arabinosa	-	v-	33	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Salicina	-	-	-		-	+		-	V+	33	+		-	-	-
D-celobiosa	-	+	67	+	33	+	+	+	-	-	-	V+	+	-	-

Tabla n°18 (cont)

	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.ichtiosmia</i>	<i>A.veronii biog. veroni</i>	<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.encheleia</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>A.media</i>	<i>A.chubertii</i>	<i>A.salmonicida ssp. salmonicida</i>
	DHG 9	DHG 8	DHG 8	DHG 7		DHG 10	DHG 15	DHG 14	DHG 1	DHG 4	DHG 16	DHG 6	DHG 5	DHG 12	DHG 3
	<b>1</b>	<b>2+3</b>	<b>7+8+9</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
Fenones♣	1	2+3	7+8+9	11	4	5	10	12	13	14	17	18	20	21	22
Nº Cepas	23	4	6	2	3	7	4	5	11	6	13	7	3	2	2
Acido de:															
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Crecimiento a: 42°C	+	v-	-	-	+	+	+	60	36	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis de arbutina	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Elastina	+	V+	-	-	33	V+	-	-	+	67	-	-	-	+	+
Esculina	-	-	33	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SDS	61	50	-	50	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Utilización de:															
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	V+	+	-	-	+	-	-
L-arginina	-	-	-	-	-	-	+	V+	V+	+	v-	+	-	+	-
L-serina	+	+	67	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Treonina	-	-	-	-	-	-	-	40	V+	V+	-	+	+	50	-
L-glutamina	+	+	+	-	+	+	-	V+	+	+	-	-	+	50	-

Tabla n°.18 (Cont)

	<i>A.jandaei</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.veronii biog. sobria</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.ichtiosmia</i>	<i>A.veronii biog. veroni</i>	<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.enzeleia</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>A.media</i>	<i>A.chubertii</i>	<i>A.salmonicida</i>	<i>ssp.salmonicida</i>
	DHG 9	DHG 8	DHG 8	DHG 7		DHG 10	DHG 15	DHG 14	DHG 1	DHG 4	DHG 16	DHG 6	DHG 5	DHG 12	DHG 3	
Fenones♣	1	2+3	7+8	11	4	5	10	12	13	14	17	18	20	21	22	
Nº Cepas	23	4	6	2	3	7	4	5	11	6	13	7	3	2	2	
Utilización de:																
Glicina	-	-	-	-	-	-	-	+	V+	+	-	57	+	-	-	
L-prolina	+	+	+		+	+		+	+	+	+		+	+	+	
Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	v-	-	+	-	
Glucosamina	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+		+	+	-	
L-lactato	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	
GABA	-	-	-	-	-	-	+	V+	V+	+	-	+	33	-	-	
L-aspartato	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	
L-glutamato	+	+	+	-	+	+	+	V+	+	+	46	+	+	+	-	

♣Especies que corresponden a cada **fenon**: **1**( *A.jandaei* DHG9); **2,3,7,9** (*A.sobria* DHG 8); **4** (*A.ichtiosmia*); **5**(*A.veronii* DHG10); **10** (*A.allosaccharophila*); **11**(*A.sobria* DHG 7); **12** (*A.trota* DHG 14); **13** (*A.hydrophila* DHG1, *A.bestiarum* DHG 2);**14** (*A.caviae* DHG 4); **17** (*A.enzeleia* DHG 16); **18** (*A.eucrenophila* DHG6); **20** (*A.media* DHG5); **21**(*A.schubertii* DHG12);**22** (*A.salmonicida* DHG3).

\*Caracteres que previamente han sido descritos como variables para *A.allosaccharophila*, por Martinez-Murcia y cols. (1992).

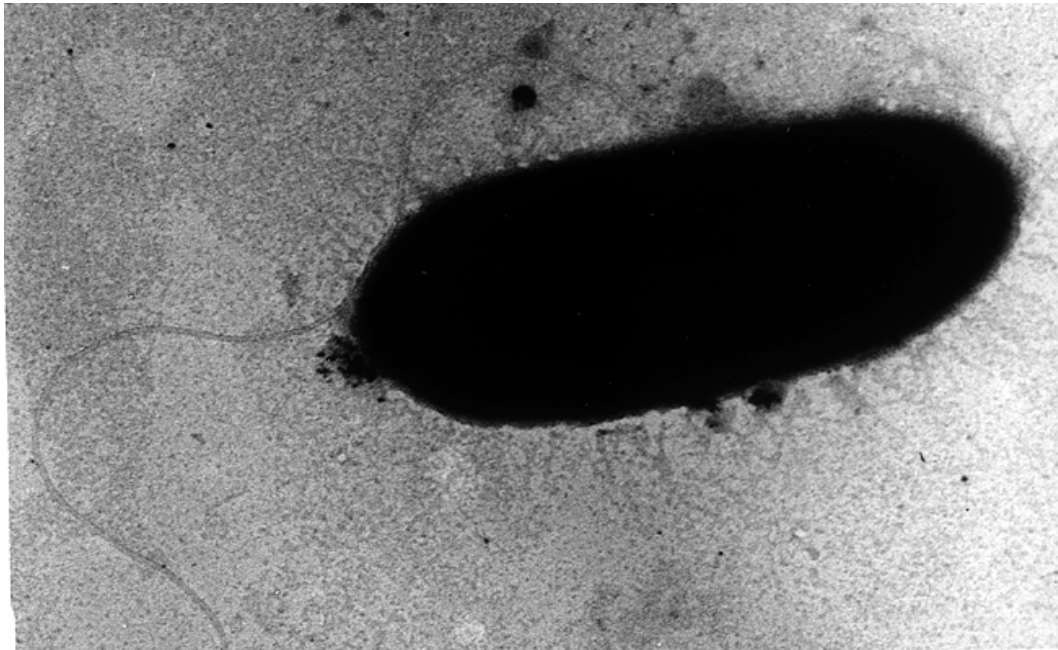
# Porcentaje de cepas positivas: +, 100-83%; v+, 82-70%; v-, 30-18%; -, 17-0%; los números indican otros porcentajes



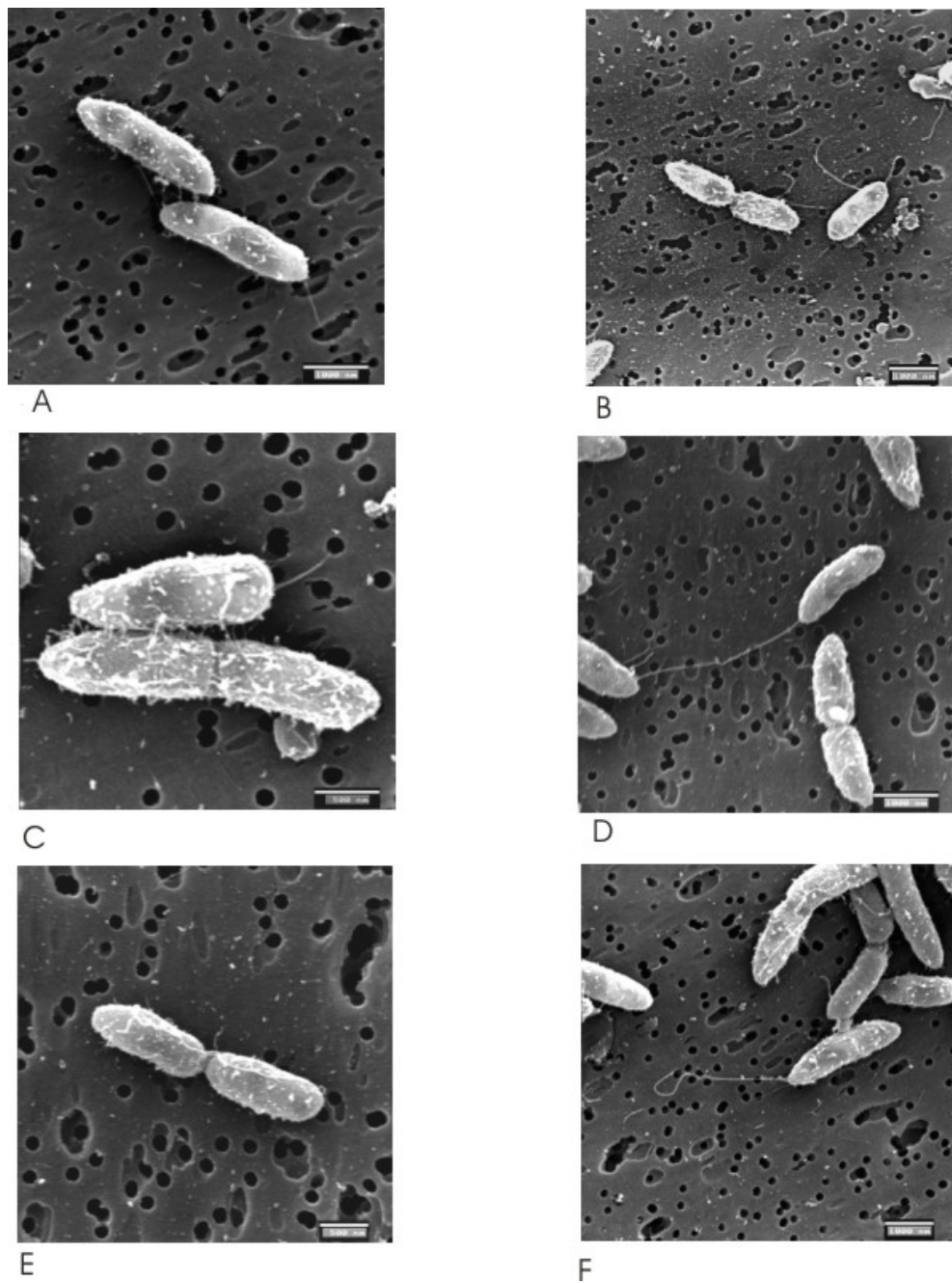
A partir de la clasificación obtenida en nuestro estudio, la cuál está basada en datos fenotípicos pero se correlaciona bien con datos genómicos para las cepas caracterizadas, proponemos una tabla diagnóstica. Así la Tabla n°18 muestra treinta y cinco tests bioquímicos que pueden ser utilizados en la identificación de las especies de *Aeromonas* incluidas en nuestro estudio. De hecho muchos de los fenones muestran porcentajes de respuestas positivas a estos tests bien por encima del 83% o bien por debajo del 17%.

#### 1.10. Morfología celular.

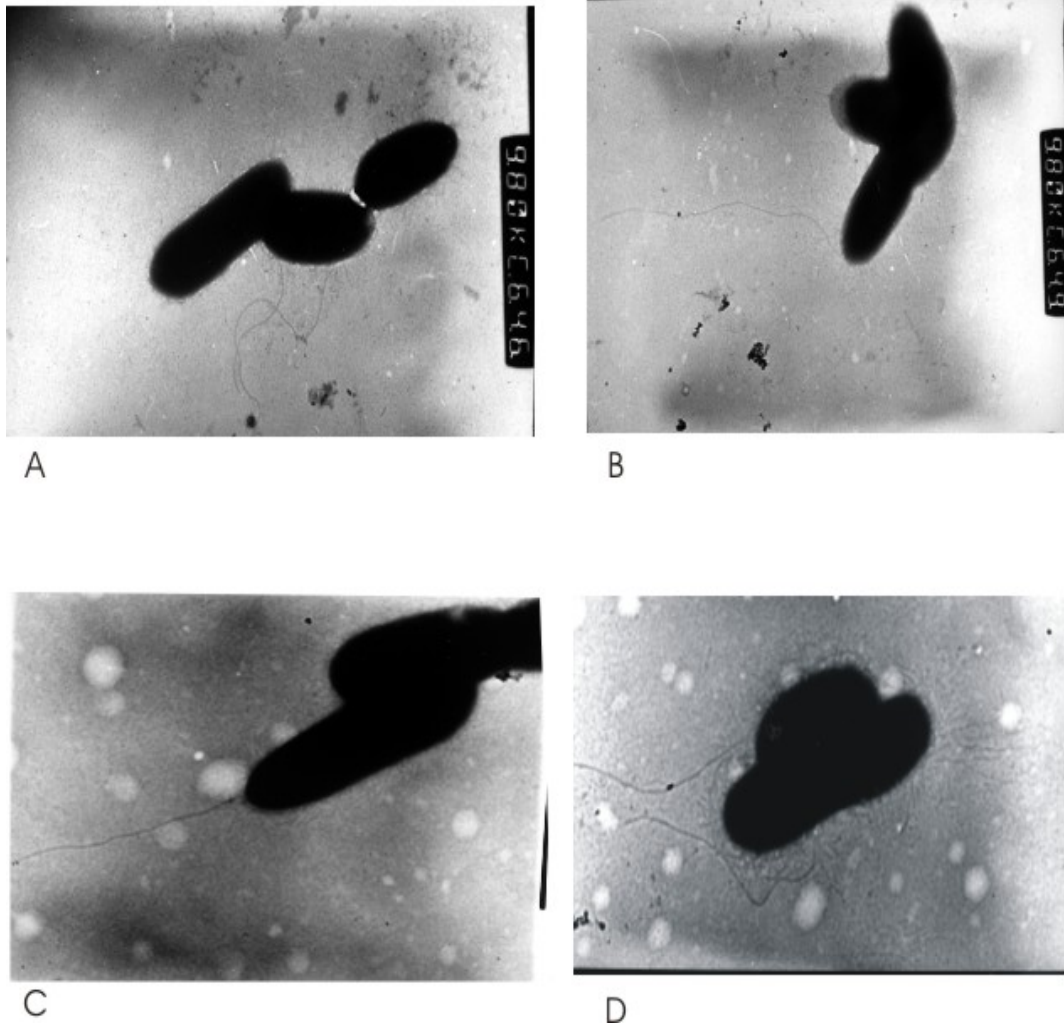
Las imágenes obtenidas en el microscópio electrónico de barrido para las preparaciones de *A.jandaei* muestran células con forma de bastoncillo (bacilos) rectos, y que poseen un único flagelo polar.



**Fig n° 8.** Microfotografía de tinción negativa en la cepa tipo de *A.jandaei*. CECT 4228<sup>T</sup> mostrando flagelo lateral y fimbrias en toda su estructura. Bacteria crecida en TSB con extracto de levadura 0,6% (p/v), cultivo estático, 2 días. Bar, 200 nm.



**Fig. n°9.** Microfotografía de scanning de *Aeromonas jandaei* CECT 4228<sup>T</sup> rodeadas superficialmente de pequeñas vesículas y alguna posible sustancia extracelular compuesta por fibras de material policasárido, extendidos como filamentos. (A-F). En ambos casos tanto vesículas como material extracelular pueden observarse adheridas en la superficie celular o libremente en el filtro. Los poros del filtro tienen 0,2 $\mu$ m de diámetro.



**Fig. n°10.** Microfotografías electrónicas de transmisión, de tinción negativa de cepa *A.jandaei*, mostrando flagelo largo, lateral polar. (A-D). Cultivo en TSB suplementado con extracto de levadura 0,6% (p/v). Cultivo estático 22°C, durante 24 hrs.

### 1.11. Discusión.

Varios estudios taxonómicos sobre el género *Aeromonas* utilizando como método la taxonomía numérica, han sido publicados previamente (Kämper y Altwegg 1992; Carnahan y Joseph 1993; Esteve 1995; Noterdame y cols. 1996; Kaznowski, 1997). Sin embargo, el presente estudio detenta con respecto a estos, diferencias en el análisis numérico de los datos. Primero en la matriz final de datos no se han incluido los caracteres bioquímicos que son uniformemente positivos o negativos para todas las cepas, en contraste con los análisis de Kämper y Altwegg (1992) y de Noterdame y cols (1996). Segundo, hemos definido los fenones a un nivel de similaridad igual o superior al 81,6% mediante el coeficiente de Jaccard ( $S_J$ ), mientras que en muchos de los trabajos previos se definieron los fenones bien a un nivel de similaridad inferior (70-80%  $S_J$ ) o bien utilizando el coeficiente de Sokal-Michener ( $S_{SM}$ ), el cuál es menos restrictivo (Kämper y Altwegg 1992; Carnahan y Joseph 1993; Esteve 1995; Kaznowski 1997). Finalmente, los parámetros metodológicos del presente estudio (índice de correlación cofenética) muestran valores aceptables. (Sneath y Jonhson 1972; Rohlf, 1998)

El hecho de que en nuestro estudio se hayan empleado condiciones más estrictas explicaría porqué cepas previamente identificadas como *A.veronii* biogrupo *sobria* (CECT 4910), *A.veronii* biogrupo *veronii* (CECT 4816, CECT 4817 y CECT 4818) y *A. jandaei* (CECT 4814) por Kämper y Altwegg (1992) no se correspondieron con los fenones que representan estos taxones. Así, según nuestros datos, la cepa CECT 4910 puede ser identificada como *A.jandaei*, la cepa CECT 4814 puede

pertenecer a la especie *A.trota*, y el resto de las cepas (CECT 4816, CECT 4817, CECT 4818) no han podido ser identificadas a nivel de especie. Destacar el hecho de que las cepas CECT 4816, CECT 4817 y CECT 4818 fueron aisladas de peces, mientras todas las cepas de referencia “*bona fide*” de *A.veronii* biogrupo *veronii* son de origen clínico (Hickman-Brenner y col, 1987).

*Aeromonas jandaei*, fue originalmente descrita como una especie de origen clínico, sin embargo una cepa aislada de langostino (CECT 4231) fue originalmente incluida en este taxón (Carnahan y cols, 1991). Desde entonces, la incidencia de *A.jandaei* en muestras clínicas ha sido baja (Joseph y col, 1991; Janda y col 1994; Hänenen y Siitonen 1995; Kühn y cols, 1997; Borrell y cols 1998). Por otra parte, cepas identificadas presuntamente como *A.jandaei* han sido aisladas frecuentemente de anguilas cultivadas que mostraban síntomas de la “enfermedad de la aleta roja”. (Esteve 1995). Los resultados del presente estudio refuerzan la distribución ambiental de *A.jandaei* ya que catorce aislados de aguas dulces y de anguilas, han quedado agrupados en el fenon 1 junto a las muestras clínicas que fueron incluidas en la descripción original de *A.jandaei*. (Carnahan y cols, 1991). Una similitud fenotípica notable entre la especie *A.jandaei* y algunos representantes de *A.veronii* biogrupo *sobria* y de la especie de *A.ichtiosmia*. Esta relación fenotípica está de acuerdo con el hecho de que estos tres taxones son especies filogenéticamente muy próximos como lo ha demostrado la secuenciación del gen 16S rRNA. (Martínez-Murcia y cols 1992; Collins y cols 1993). En vista de estos resultados hemos realizado la hibridación DNA-DNA (Resultados y discusión, Pág. 127) para determinar la posición taxonómica de las cepas de *A.jandaei* ambientales, y también

para revisar la relación genómica entre las especies (*A.jandaei*, *A.veronii* y *A.ichtiosmia*).

Recientemente han sido publicados resultados de homología DNA-DNA entre las especies *A.veronii* y *A.ichtiosmia* (Huys y cols 2001), que son contradictorios con los descritos originalmente por Schubert y cols (1990b).

Los taxones *A.sobria* (DHG7) y *A.veronii* biogrupo *sobria* (DHG8) actuales fueron originalmente incluidos en la especie *A.sobria* por Popoff y colaboradores (Popoff y cols, 1981; Popoff 1984). Curiosamente estas cepas de Popoff sólo han sido caracterizadas en el análisis numérico del estudio realizado por Popoff y Verón (1976) y en el presente estudio.

Además, también hemos caracterizado muchas de las cepas de *A.veronii* biogrupo *sobria* de Altwegg así como la cepa tipo de la especie *A.ichtiosmia* la cuál ha sido recientemente situada en *A.veronii*. (Huys y cols 2001). En contraste con los resultados obtenidos por Popoff y Verón (1976) nuestro estudio ha mostrado que muchas de estas cepas de referencia, no se agruparon juntas sino que quedaron distribuidas en varios fenones o bien permanecieron sin agrupar. Este resultado sugiere que la diversidad existente dentro del grupo denominado “fenospecie de *A.sobria*” es muy grande y por tanto que el fenotipo para *A.sobria* propuesto por Popoff (1984) no es adecuado. Así el fenon 11 representó a la especie *A.sobria* (DHG 7) mientras que la especie *A.veronii* biogrupo *sobria* (DHG8), quedó representada por dos “núcleos fenotipicos”. El primero correspondió a los fenones 2 y 3 y estuvo relacionado con la cepa CECT 4246 (ATCC 9071), y el segundo incluye los fenones 7, 8 y 9 y estuvo relacionado con la “verdadera” cepa de referencia del DHG 8, la cuál es la cepa Popoff 224 (CECT 4835=ATCC51106). Este hallazgo demuestra que las dos cepas de

referencia de la genoespecie 8 (DHG 8) son fenotípicamente diferentes y por tanto nosotros recomendaríamos el uso de ambas, y no sólo de la CECT 4246, en posteriores estudios taxonómicos. Además, la cepa tipo de *A.ichtiosmia* estuvo asociada al fenon 4 y por lo tanto quedó claramente alejada de aquellos grupos identificados como *A.veronii* biogrupo *sobria* (DHG8). Este resultado contrasta con lo publicado por Huys y cols 2001, que describieron una relación fenotípica estrecha entre *A.ichtiosmia* y *A.veronii* biogrupo *sobria* (DHG8), no obstante estos autores utilizaron muy pocas cepas en su estudio fenotípico.

La especie *A.veronii* biogrupo *veronii* (DHG 10) estuvo representada por el fenon 5, que quedó claramente separado de los grupos identificados como *A.veronii* biogrupo *sobria* (DHG 8). Nuestro análisis numérico muestra una vez más que los dos biogrupos de la especie *A.veronii* no están fenotípicamente relacionados, de acuerdo con lo descrito previamente por otros autores (Kämpfer y Altwegg 1992; Carnahan y Joseph 1993). Esto debe hacer recordar que el presente estatus de *A.veronii* sólo está fundamentado en datos genómicos (Hickman-Brenner y cols 1987; Altwegg y cols. 1990), y por tanto no existe descripción taxonómica que recoja las características de la especie *A.veronii* sino sólo de cada uno de sus biogrupos.

Las cepas de referencia de *A.allosaccharophila* constituyeron un grupo fenotípico claramente separado de aquellos representantes de la especie *A.veronii* (biogrupos *sobria* y *veronii*) y de *A.sobria*. Estos resultados refuerzan el actual estatus la especie *A.allosaccharophila* (Martínez-Murcia y cols, 1992; Esteve 1995; Esteve y cols 1995a), pero se oponen a las conclusiones publicadas por Huys y cols (1996); Huys y cols (2001).

Las especies *A.eucrenophila* y *A.enceleia* han sido recientemente enmendadas sobre la base de controvertidos datos de homología DNA-DNA (Huys, Kämper, Altwegg, Coopman, Janssen, Gillis y Kesters 1997), por lo que alguna cepa de *A.eucrenophila* y las dos cepas del grupo de hibridación 11 (DHG11) fueron situadas dentro de *A.enceleia*. En contraposición a estos resultados, nuestro estudio mostró los límites de estos taxones, tal como fueron descritos inicialmente (Schubert y Hegazi 1988; Esteve y cols 1995b). Ni las cepas de *A.eucrenophila* ni las cepas del DHG11 se agruparon junto con las cepas de referencia "*bona fide*" de *A.enceleia*. Curiosamente Huys y cols (1997) ya describieron esta falta de relación a nivel fenotípico entre *A.enceleia* y la genoespecie DHG11; sin embargo ellos no lo consideran significativa.

Por otra parte datos filogenéticos recientes no apoyan la inclusión de la genoespecie DHG 11 en la especie *A.enceleia* (Martínez-Murcia, 1999).

Otras cepas recientemente aisladas han sido incluidas en la especie *A.enceleia* sobre la base de datos fenotípicos y de análisis AFLP/RFLP. (Huys y cols 1997). De hecho, los datos de homología DNA-DNA entre estos aislados y de la cepa tipo de *A.enceleia* no han sido publicados. (Huys y cols, 1996). Nuestro estudio ha mostrado que muchas de esas cepas forman un fenon claramente segregado de *A.enceleia* y de otras especies comunmente reconocidas en el género *Aeromonas*. Por lo que pudieran representar un nuevo taxón. Este resultado destaca la necesidad de revisar el estatus de estas cepas de referencia; debe ser revisado, más aún cuando este estatus está basado en herramientas taxonómicas, que actualmente son controvertidas. (Esteve 1997).



## 2. HIBRIDACIÓN DNA-DNA ENTRE CEPAS DE LAS ESPECIES *A. jandaei*, *A. ichthiosmia*, y *A. veronii*

A partir del análisis numérico de las cepas estudiadas (ver apartado 1; Resultados) se encontró una relación fenotípica relativamente elevada entre representantes de las especies *A. jandaei*, *A. ichthiosmia*, y *A. veronii* biogrupo *sobria*. Así, la mayoría de las cepas de referencia de estos taxones quedaron agrupadas en los fenones 1 al 4, a un nivel de similaridad del 80% $S_J$  (Figura nº6) o del 90,1% $S_{SM}$  (Figura nº7). Por ello hemos incluido estas cepas en un estudio genómico de hibridación DNA-DNA, con objeto de conocer su relación filogenética y así estudiar los límites entre dichas especies. Este estudio de hibridación DNA-DNA también tuvo como propósito conocer el porcentaje de homología genómica entre las cepas agrupadas en el fenon 1, el cual incluye la mayoría de las cepas de referencia de la especie *A. jandaei* y 14 aislamientos sacarosa-positivos recuperados de anguila enferma (Figura nº6; Tabla nº9).

### 2.1. Contenido en bases Guanina-Citosina (%G+C) del DNA de las cepas de *Aeromonas*

La Tabla nº 19 muestra los valores del contenido en G+C, y de la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) para los DNAs de las cepas estudiadas. Estos resultados representan el valor medio obtenido a partir de tres curvas de fusión realizadas sobre una misma muestra de DNA bacteriano.

El contenido en G+C del DNA de las cepas incluidas en el fenon 1 (*A. jandaei*) oscila entre 58,1-61,1 mol% (Tabla nº 19). Esta variación de tan sólo tres unidades es similar a lo descrito para cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie de *Aeromonas* (Popoff y cols, 1981; Hickman-Brener y cols, 1987; Esteve y cols, 1995). El contenido en G+C de

los DNAs de las cepas agrupadas en los fenones 2 y 3 oscila entre 61,1-61,9 mol% y 60,0-60,7 mol%, respectivamente (Tabla nº 19). Finalmente, el DNA de la cepa tipo de la especie *A. ichthiosmia* tiene un contenido en G+C de 60,3 mol%, y este valor en los DNAs de las cepas de referencia de la especie *A. veronii* (CECT 4257<sup>T</sup> y CECT 4835) es respectivamente de 59,4 mol% y 60,3 mol% (Tabla nº 19). Nótese que estamos describiendo por primera vez el contenido en G+C del DNA de todas estas cepas, incluso para aquellas cepas que han sido incluidas en la descripción original de las especies *A. jandaei* y *A. veronii* (Carnahan y cols, 1991; Hickman-Brener y cols, 1987).

En general, los valores de G+C del DNA de las cepas estudiadas se encuentran dentro del rango descrito para el género *Aeromonas*, el cual oscila entre 57,0 a 63 mol% (Tablas nº19 y 20). (Popoff y cols, 1981; Popoff, 1884; Allen y cols, 1983; Hickman–Brener y cols, 1987; Schubert y Hegazi, 1988; Schubert y col 1990a, b; Esteve y cols, 1995a, b; Huys y cols, 1997).

Además hay que destacar que estos resultados del contenido en G+C del DNA refuerzan los datos fenotípicos previos pues la diferencia de tan sólo 3-4 unidades, existente entre los valores de G+C del DNA de estas cepas puede estar relacionada con la existencia de homología genética, la cual quedaría de entrada descartada si los valores del %G+C encontrados fueran muy dispares. No obstante, el porcentaje de homología genética entre DNAs de cepas bacterianas sólo puede ser evaluado mediante hibridación DNA-DNA. (Stackebrandt y Goebel, 1994).

## **2.2. Homología genómica entre las cepas de *Aeromonas***

La Tabla nº 20 muestra los valores del porcentaje de homología para los DNAs de las cepas estudiadas obtenidos mediante hibridación DNA-DNA

utilizando la técnica de hibridación competitiva en membranas de nitrocelulosa (Johnson, 1994) y una temperatura de hibridación de 55,5-56°C.

El porcentaje de homología entre los DNAs de las cepas agrupadas en el fenon 1 (*A. jandaei*) y el DNA de la cepa tipo de esta especie (CECT 4228<sup>T</sup>) oscila entre 70 y 100%, con la excepción de lo encontrado para los aislados 28, 36 y 146 (Tabla n° 19).

**Tabla nº 19.** Valores del contenido en G+C, y de temperatura media de fusión (T<sub>M</sub>) para los DNAs de cepas estudiadas

		T <sub>M</sub>	G+C	Especie.
Cepas de referencia de <i>A.jandaei</i>	CECT 4228 <sup>T</sup>	78,4	58,8	<i>A.jandaei</i> <sup>T</sup>
	CECT 4229	78,4	58,8	
	CECT 4231	78,8	59,6	
	CECT 4813	78,7	59,4	
	CECT 4838	79,2	60,4	
	CECT 4901	79,3	60,7	
		(79,5)	(61,09)	
Cepas del fenon <i>A.jandaei</i>	24	78,2	58,3	
	25	78,2	58,3	
	26	79,9	61,9	
	27	78,2	58,3	
	28	78,1	58,1	
	29	78,1	58,1	
	31	79,0	60,0	
	32	79,0	60,0	
	35	79,3	60,7	
	36	78,8	59,6	
	37	78,6	59,2	
	38	79,0	60,0	
	125	80,5	63,1	
	CECT 4335	78,7	59,4	
	CECT 4815	78,6	59,2	
	CECT 4910	79,5	61,09	
CECT 4818	79,9	61,9		
Otras	CECT 4902	79,2	60,04	<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i>
	CECT 4903	79,3	60,07	<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i>
	CECT 4906	79,5	61,09	<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i>
	CECT 4911	79,9	61,9	<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i>
	CECT 4257	78,7	59,4	<i>A.veronii</i> bio <i>veronii</i> <sup>T</sup>
	CECT 4835	79,1	60,3	<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i> <sup>T</sup>
	CECT 4486	79,1	60,3	<i>A.ichtiosmia</i>
	146	79,4	61,0	<i>Aeromonas</i> sp

Estos valores de homología genómica ( $\geq 70\%$ ) corresponden a los habitualmente aceptados para la definición de especie bacteriana (Stackebrandt y col, 1994).

Así estas cepas, entre las que se encuentran muchos aislados sacarosa-positivos y la cepa clínica CECT 4910, pertenecen a la genoespecie nº 9 (DHG9) y por lo tanto a la especie *A. jandaei*.

Por otra parte, el porcentaje de homología genómica entre estas cepas de *A. jandaei* DHG9 y cepas de referencia de las especies *A. ichthiosmia* (CECT 4486<sup>T</sup>) y *A. veronii* (CECT 4257<sup>T</sup> y CECT 4835) es claramente inferior al 70% (Tabla nº 20). Por tanto, la técnica de hibridación DNA-DNA claramente permite separar la especie *A. jandaei* DHG9 de las especies *A. ichthiosmia* y *A. veronii* a pesar de que estos tres taxones están estrechamente relacionados según los datos obtenidos por la comparación de las secuencias del gen del RNAr 16S (Martinez-Murcia y cols, 1992a), el contenido en G+C del DNA (Tabla nº 20) y sus caracteres fenotípicos (Figuras nº6 y 7).

Los experimentos de hibridación DNA-DNA realizados de forma recíproca entre los DNAs de la cepa tipo de *A. ichthiosmia* y las cepas de referencia de *A. veronii* (biogrupo *veronii* CECT 4257<sup>T</sup>; biogrupo *sobria* CECT 4835) han mostrado valores de homología alrededor del 45% (Tabla nº 20), lo que indicaría se trata de especies distintas. Así nuestros resultados están de acuerdo con el valor de un 60% de homología genómica para el par CECT 4486<sup>T</sup>/CECT 4835 originalmente reportado por Schubert y cols, 1990b) mediante el método espectrofotométrico de De Ley y cols (1970). No obstante, nuestros resultados son opuestos al valor de un 96% de homología genómica para el par CECT 4486<sup>T</sup>/CECT 4257<sup>T</sup> recientemente publicado por Huys y cols. (2001), valor obtenido mediante el método de hibridación en microplaca (Goris y cols. 1998). Nótese que Huys y cols. (2001) basaron en este dato de homología DNA-DNA su propuesta de considerar la especie *A. ichthiosmia* como un sinónimo posterior de la

especie *A. veronii*. En nuestra opinión esta propuesta debería reconsiderarse por las diferencias notables existentes en los datos de homología genómica entre *A. ichthiosmia*/*A. veronii*, según los estudios publicados por diferentes autores (Schubert y cols., 1990; Huys y cols., 2001; Tabla n°20).

Por otra parte, las cepas agrupadas en los fenones 2 y 3 (Figura n° 6) las cuales supuestamente representaban uno de los núcleos fenotípicos de la especie *A. veronii* biogrupo *sobria* (ver apartado 1; Resultados), están relacionadas con las especies *A. jandaei*, *A. ichthiosmia* y *A. veronii* a un nivel de homología genómica inferior al 50% (Tabla n°20), y por tanto no pertenecen a ninguno de estos tres taxones. Nótese que nuestros datos (Tabla n° 20) son la primera referencia del porcentaje de homología DNA-DNA entre estas cepas (CECT 4902, CECT 4903, CECT 4906, y CECT 4911) y las cepas de referencia de la especie *A. veronii* (CECT 4257<sup>T</sup> y CECT 4833), a pesar de las primeras han sido profusamente empleadas como referencia de *A. veronii* biogrupo *sobria* (Huys y cols., 1996; Huys y cols., 2001). No obstante, nuestros resultados indican que estas cuatro cepas (CECT 4902, CECT 4903, CECT 4906, y CECT 4911) no deben incluirse en la especie *A. veronii*, y además ponen de manifiesto que el llamado “biogrupo *sobria*” de la especie *A. veronii* es un taxón heterogéneo que, en nuestra opinión, requiere una revisión profunda. De hecho la cepa CECT 4911 ha sido recientemente clasificada como *A. allosaccharophila* según datos de secuenciación del gen *gyrB* (Yañez y cols, 2003). Sin embargo otros autores siguen extendiendo que no revisando el citado biogrupo *sobria*, como es el caso de la propuesta de considerar *A. culicicola* como un sinónimo tardío de *A. veronii*, la cual ha sido recientemente publicada por Huys y cols. (2001).

El porcentaje de homología genómica entre las cepas de referencia de *A. veronii* (biogrupo *veronii* CECT 4257<sup>T</sup>; biogrupo *sobria* CECT 4835) es del 83-100% (Tabla nº 19), indicando que pertenecen a la misma especie genómica. Por tanto estos resultados coinciden con los publicados previamente por otros autores (Hickman-Brenner y cols. 1987; Martínez-Murcia y cols, 1992a; Yañez y cols. 2003) en la clasificación de ambas cepas en un mismo taxón; en la especie *A. veronii*.

Los datos de porcentaje de hibridación DNA-DNA obtenidos en nuestro estudio (Tabla nº 20) han presentado una desviación típica global del 6%, la cual es comparable a lo descrito para estudios de hibridación DNA-DNA realizados mediante otros métodos (Goris y cols. 1998; Christensen y cols. 2000; Angen y cols. 1999). Además, hemos encontrado que los datos de homología DNA-DNA altos (70-100%; Tabla nº 20) han presentado una desviación típica media del 2%; mientras que la desviación típica media para los datos de homología DNA-DNA bajos (6-63%; Tabla nº 19) ha sido del 7%, lo cual viene a destacar que los valores de homología DNA-DNA obtenidos en diferentes ensayos para cepas que pertenecen a una misma especie genómica son muy estables.

En conclusión, nuestros datos fenotípicos (Figura nº 6) y genómicos (Tabla nº 20) apoyan la clasificación dentro de la especie *A. jandaei* de cepas sacarosa-positivas aisladas de anguila o de heces (CECT 4910, previamente identificada como *A. veronii* biogrupo *sobria*) (Tablas nº 7 y 8), por lo que proponemos la enmienda de la especie *A. jandaei* para incluir estas nuevas cepas ambientales y clínicas.

Tabla nº20. Porcientos de hibridación DNA-DNA y composición de bases de DNA para *A.jandaei* y las especies relacionadas.

Origen del DNA no marcado	Fenon	Contenido de G+C. (mol%)	DNA marcado con <sup>3</sup> H			
			<i>A.jandaei</i> . CECT 4228 <sup>T</sup>	<i>A.ichtiosmia</i> . CECT 4486 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> . CECT 4257 <sup>T</sup>	<i>A.veronii</i> CECT 4835
<i>A.jandaei</i> CECT4228 <sup>T</sup> *	1	58,8	<b>100</b>	28	18	23
<i>A.jandaei</i> CECT 4813*	1	59,4	<b>100</b>	31	29	41
<i>A.jandaei</i> CECT 4229*	1	58,8	<b>94</b>	10	33	15
<i>A.jandaei</i> CECT 4838*	1	60,4	<b>85</b> ‡	13	24	15
<i>A.jandaei</i> CECT 4901*	1	61,1	<b>80</b>	25	42	30
<i>A.jandaei</i> CECT 4231*	1	59,6	<b>71</b>	19	20	8
<i>A.jandaei</i> 26	1	60,9	<b>85</b> †	20	12	46
<i>A.jandaei</i> 25	1	58,3	<b>85</b>	45	32	18
<i>A.jandaei</i> 32	1	60,0	<b>85</b>	21	32	21
<i>A.jandaei</i> 38	1	60,0	<b>83</b>	50	16	17
<i>A.jandaei</i> 125	1	ND	<b>82</b>	11	37	25
<i>A.jandaei</i> 31	1	60,0	<b>80</b>	27	25	50
<i>A.jandaei</i> 27	1	58,3	<b>79</b>	48	31	28
<i>A.jandaei</i> 29	1	58,1	<b>75</b>	12	3	40
<i>A.jandaei</i> CECT 4815	1	59,2	<b>74</b>	35	18	42
<i>A.jandaei</i> 24	1	58,3	<b>72</b>	30	23	29
<i>A.veronii</i> CECT 4910	1	61,1	<b>70</b> ‡	10	12	17
<i>A.jandaei</i> 37	1	59,2	<b>70</b> ‡	27	31	25
<i>A.jandaei</i> 35	1	60,7	<b>70</b>	5	32	40
<i>A.jandaei</i> 28	1	58,1	63	ND	11	43
<i>A.jandaei</i> 36	1	59,6	62	9	19	33
<i>A.jandaei</i> 146	1	61,0	59	26	56	32
<i>A.veronii</i> CECT 4906	2	61,1	44	23	30	39
<i>A.veronii</i> CECT 4911	2	61,9	31	12	15	25
<i>A.veronii</i> CECT 4902	3	60,0	25	6	50	26
<i>A.veronii</i> CECT 4903	3	60,7	ND	18	41	51
<i>A.ichtiosmia</i> CECT 4486 <sup>T</sup>	4	60,3	40	<b>100</b>	43	52
<i>A.veronii</i> bio <i>veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	5	59,4	45	45	<b>100</b>	<b>83</b>
<i>A.veronii</i> bio <i>sobria</i> CECT 835 <sup>T</sup>	7	60,3	34	45	ND	<b>100</b>

\* Cepa incluida en la descripción original de la especie *A.jandaei*. (Carnahan y cols 1991).‡ Hibridaciones reciprocas que alcanzan valores de relación DNA-DNA entre 75-87%. **ND**. No determinado



**2.3. Enmienda a la descripción de la especie *Aeromonas jandaei* (Carnahan y cols. 1992)**

Bacilos rectos, Gram-negativos, y móviles por un único flagelo polar. Las colonias se desarrollan sobre el medio TSA en 24 horas a 28°C y no presentan pigmento colonial ni difusible. Crecen sobre agar MacConkey y también sobre agar TCBS. Quimiorganotrofo con metabolismo oxidativo y fermentativo. Produce ácido y gas a partir de glucosa. Presenta reacción positiva a las pruebas citocromo oxidasa de Kovac y catalasa. Reduce nitrato a nitrito. No presenta crecimiento expansivo sobre medio sólido (1,5% agar; p/v) y es resistente al agente vibriostático O129 (150 µg). Crece en presencia de 0-3% (p/v) de cloruro sódico, a temperaturas en el rango de 4-42°C y mayormente bajo condiciones de pH alcalino ( $\leq$  pH 8,5). Todas las cepas producen sulfhídrico de L-cisteína. Positiva para las pruebas del indol, ADH (Moeller), Arginina de Thornley, oxidación de gluconato y Voges-Proskauer pero negativa para la descarboxilación de L-ornitina y de L-glutamina. Todas las cepas producen ácido de fructosa, D-galactosa, glicerol, D-manosa, D-manitol, D-ribosa, y D-trealosa. Ninguna cepa produce ácido de adonitol, D-amigdalina, D-arabinosa, arbutina, dulcitol, 2-deoxi-D-glucosa, inositol, lactosa, D-melibiosa, D-rafinosa, D-ramnosa, salicina, D-sorbitol, L-sorbosa, xilitol, o xilosa. Todas las cepas usan los siguientes substratos como fuente de carbono y de energía: N-acetilglucosamina, fumarato, D-gluconato, L-glutamato, L-glutamina, malato, L-prolina, y succinato. Ninguna cepa utiliza trans-aconitato, adenina, L-alanina,  $\gamma$ -aminobutirato, L-arabinosa, L-arginina, L-asparagina, L-aspartato, benzoato, L-carnosina, L-citrulina, L-cisteína, D-galacturonato, D-gluconato, glutarato, glutatión, glicina, guanina, L-isoleucina, L-lactato, L-leucina, L-lisina, maleato, malonato, L-metionina, mucato, L-ornitina, l-fenilalanina, propionato, putrescina, sarcosina, L-tartrato, L-treonina, L-

triptófano, L-tirosina, L-valina, o xantina. Las cepas hidrolizan caseína y gelatina pero no alginato, arbutina o esculina. Todas las cepas presentan actividad amilasa y lecitinasa y producen  $\beta$ -hemolisinas capaces de romper los eritrocitos humanos. Todas las cepas son resistentes a ampicilina y penicilina pero son sensibles a amicacina, gentamicina, tetraciclina y tobramicina (Carnahan y cols. 1991a; Esteve 1995). Otros caracteres fenotípicos que presentan variabilidad entre las cepas se muestran en la Tabla nº 21. El contenido en G+C del DNA oscila entre 58,1 y 61,1 mol% (método Tm).

Aislados de muestras clínicas, agua dulce, gambas y anguilas (*Anguilla anguilla*). Virulenta para anguila (Esteve y cols., 1993).

La cepa tipo es la ATCC 49568<sup>T</sup> (=CECT 4228<sup>T</sup>) y presenta todas las propiedades detalladas anteriormente para la especie. Además, la cepa tipo es positiva para LDC (Moeller), produce ácido de maltosa, hidroliza elastina, SDS y Tween 80, y utiliza acetato, citrato y L-serina como fuentes de carbono y energía (Tabla nº 21). No obstante esta cepa es negativa para la producción de ácido de sacarosa y de D-celobiosa, no crece a pH 4,5 y no utiliza DL-glicerato, L-histidina o D-glucosamina. La cepa tipo fue aislada de heces. El contenido en G+C de su DNA es de 58,8 mol%.

**Tabla n°21.** Características variables de la especie *A. jandaei* y su distribución en dependencia del origen de las cepas.

Características	Fenotipo*		Cepas positivas (%) <sup>v</sup>	Resultados cepa CECT 4228 <sup>T</sup>
	Clínico	Ambiental		
LDC	9/10 <sup>†</sup>	10/12	86	+
Crecimiento a pH 4,5	2/7	4/12	32	-
Producción de ácido de:				
Sacarosa	1/10 <sup>†</sup>	11/12	55 <sup>‡</sup>	-
D-celobiosa	0/10 <sup>†</sup>	3/12	14	-
Maltosa	6/7	11/12	90	+
Hidrólisis de:				
SDS	3/7	9/12	63	+
Elastina	7/10 <sup>†</sup>	10/12	77 <sup>‡</sup>	+ <sup>‡</sup>
Tween 80	5/7	5/12	53	+
Utilización de:				
Acetato	6/7	9/12	79	+
DL-glicerato	1/7	3/12	21	-
Citrato	9/10 <sup>†</sup>	10/12	86	+
L-histidina	2/7	6/12	42	-
L-serina	7/7	10/12	90	+
D-glucosamina	5/7	12/12	90	-
Virulencia para:				
Anguilas	0/2	4/8	40	-
Ratones	4/5 <sup>¶</sup>	4/8	62	+

Cepas origen clínico: (CECT num.) 4228<sup>T</sup>, 4229, 4813, 4815, 4838, 4901 y 4910. Cepas ambientales: CECT 4231, 24, 35, 26, 27, 38, 25, 31, 32, 29, 37 y 125.

LDC, lisine descarboxilasa (Moeller's medium). SDS.

\* No resultados positivos/no resultados testados

<sup>†</sup> Resultados reportados por Carnahan y cols. (1991) para las cepas AS-206, AS 235 y AS 176

<sup>‡</sup> Respuestas consideradas de cualquier modo como negativas. (Carnahan y cols 1991a; Hasan y cols 1992).

<sup>§</sup> Cepas que muestran una LD<sub>50</sub> inferior a 107.5 cfu. (Esteve y cols, 2002)

<sup>¶</sup> Reportadas por Janda y Kokka (1991) para cepas clinicas de *A. jandaei*.

#### 2.4. Diferenciación fenotípica de la especie *A. jandaei*

La especie *A. jandaei* puede ser fácilmente diferenciada de los taxones *A. veronii* biogrupo *veronii*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. eucrenophila*, y *A. encheleia* por la ausencia de producción de ácido a partir

de salicina y por su incapacidad de hidrolizar esculina y arbutina (Tabla n° 22). Además, *A. jandaei* puede separarse de *A. caviae* y de *A. media* por su producción de gas de glucosa y su respuesta positiva a los ensayos Voges-Proskauer y de oxidación de gluconato. Las especies *A. jandaei* y *A. schubertii* pueden separarse por la respuesta negativa de la última a la producción de indol, de ácido de D-manitol y de gas de glucosa. En la Tabla n° 22 se detallan las pruebas clave que permiten diferenciar *A. jandaei* de las especies de *Aeromonas* fenotípicamente más próximas (*Aeromonas* sp. fenones 2 y 3; *A. ichthiosmia*; *A. veronii* biogrupo *sobria* fenones 7-9; *A. allosaccharophila*; *A. trota*; *A. enteropelogenes*; *A. popoffii*; y *A. sobria*). Las especies *A. culicicola* y *A. jandaei* no pueden ser diferenciadas en base al perfil fenotípico descrito por Pidiyar y cols. (2000).

### **2.5. Importancia clínica y patogeneidad de la especie *A. jandaei***

El hallazgo de que *A. jandaei* incluya cepas sacarosa-positivas es muy importante para revisar la incidencia clínica de esta especie pues todas las cepas sacarosa-positivas y salicina-negativas de *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas han sido identificadas hasta la fecha como *A. veronii* biogrupo *sobria* (Carnahan y cols., 1991; Abbott y cols., 1992). Así, nuestro estudio ha demostrado que la cepa CECT 4910, aislada de heces y recibida como *A. veronii* biogrupo *sobria* (Tabla n° 7), es una cepa perteneciente a la especie *A. jandaei* (Figura n° 6; Tabla n°20). En nuestra opinión, tales identificaciones erróneas de cepas de *A. jandaei* sacarosa-positivas podrían explicar la escasa incidencia que la especie *A. jandaei* ha presentado en asociación a enfermedades infecciosas del ser humano desde que fué descrita por Carnahan y cols. (1991a) (Janda y Abbott, 1998).

**Tabla nº 22.** Claves de diferenciación fenotípica para la especie *A. jandaei*

Características	<i>A.jandaei</i>	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A.ichitiosmia</i>	<i>A.veronii bio. veronii</i>	<i>A.veronii bio. sobria</i>	<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.trota</i>	<i>A.enteropelogenesis</i>	<i>A.popoffii</i>	<i>A.sobria</i>
Producción de ácido de:										
Salicina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	25	-	-	33	67	-	-	-	-
D-Celobiosa	-†	+	-	80	67	+	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-‡	-	-	-	+	+
LDC	+†	+	-	+	33	+	+	+	-	+
Crecimiento a 42°	+	-	+‡	80	-	+	60	+	-	-
Hidrólisis de:										
Arbutina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SDS	63	50	-	+	-	-	+	+	+	+
Utilización de:										
L-lactato	-	-	-	-	-	-	+	-	-‡	-
Acetato	V+	50	+	+	-	+	+	+	-	-
Citrato	+†	+	-	80	50	67	+	+	+	+
L-Glutamato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Alanina	-	-	-	40	-	-	+	+	-‡	-
L-Arginina	-	-	-	-	-	+	V+	-	-	-
L-Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glicina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

*A. jandaei*: cepas 24, 35, 26, 27, 38, 25, 31, 32, 29, 37, 125 y CECT nº. (4228<sup>†</sup>, 4229, 4231, 4813, 4815, 4838, 4901, 4910); *Aeromonas sp.* cepas (CECT nº 4902, 4903, 4906, 4911); *A. veronii bio. sobria*: cepas (CECT nº 4251, 4835, 4907 a 4909, 4912).

Porcentaje de cepas positivas: +, 100-86%; v+, 85-80%; -, 14-0%; los números indican otros porcentajes.

LDC, lisina descarboxilasa (Moeller's medium); SDS, dodecil sulfato de sodio.

Datos de este estudio (apartado I. Resultados y Discusión); Kämpfer y Altwegg (1992).

† Resultados reportados por Carnahan y cols. (1991a) para las cepas AS-206, AS-235 y AS-176.

‡ Respuestas diferentes reportadas (Schubert y cols. 1990b; Huys y cols., 1997; Huys y 2001).

Nuestros resultados muestran, además, que la especie *A. jandaei* es común en muestras ambientales (aguas potables y peces), ya que anteriormente el único aislado ambiental conocido era una cepa recuperada de gamba (CECT 4231) (Carnahan y cols., 1991a). Nótese que los aislados ambientales de *A. jandaei* muestran valores de dosis letal 50 para ratón

similares a los descritos para los aislamientos clínicos de la especie (Esteve y cols., 2003), perteneciendo las cepas de *A. jandaei* a la categoría de virulencia alta ( $DL_{50} < 10^{7,0}$  ufc/ratón) o moderada ( $DL_{50} 10^{7,0}-10^{7,5}$  ufc/ratón) descritas por Janda y Kokka (1991), con independencia de que su origen sea ambiental o clínico. Además, prácticamente todas las cepas de *A. jandaei* son capaces de hidrolizar elastina (Tabla nº 16), característica generalmente asociada con el potencial patógeno en otras especies de *Aeromonas* (Hsu y cols., 1981).

En contra de lo publicado anteriormente por otros autores (Hasan y cols., 1992), la mayoría de las cepas de *A. jandaei* han sido elastasa-positivas en nuestro estudio. Este resultado generalmente positivo sobre el medio que hemos utilizado, el medio de Hsu y cols. (1981), podría ser debido a que éste presenta características propias que podrían mejorar la capacidad elastolítica de las cepas. Así el medio de Hsu y cols. (1981) presenta cantidades elevadas de elastina (1%, p/v) pero no de triptona (0,2%, p/v) y tiene también micronutrientes (L-cisteína y  $Ca^{2+}$ ) que permitirían estabilizar la estructura de la enzima elastina y con ello mejorar su función. Además de todo esto, el pH alcalino (pH 8,0) del medio de Hsu y cols. (1981) es el óptimo para la mayoría de las elastasas bacterianas descritas (Wretlind y Wadström, 1977; Kothary y Kreger, 1985). Escogimos el medio de Hsu y cols. (1981) para ensayar la capacidad elastolítica de las cepas de *A. jandaei* porque éste se diseñó para evaluar la actividad elastolítica de *A. hydrophila*.

#### 4. CONCLUSIONES GENERALES.

1. La taxonomía numérica fenotípica es una buena herramienta taxonómica para delimitar e identificar las especies de *Aeromonas* móviles pues se observa una excelente correlación entre los grupos definidos según esta metodología y los datos genómicos y filogenéticos disponibles para dichas cepas. No obstante la excepción la hemos encontrado en el caso de la cepa tipo de la especie *A. bestiarum* la cual se ha agrupado en el fenon 13 junto con todas las cepas de *A. hydrophila*.

2. La mayoría de las especies de *Aeromonas* han formado un único grupo en el análisis numérico ( $S_J$ /UPGMA). Este es el caso de *A. jandaei* (fenon 1), *A. sobria* (fenon 11), *A. ichthiosmia* (fenon 4), *A. allosaccharophila* (10), *A. trota* (fenon 12), *A. hydrophila* (fenon 13), *A. caviae* (fenon 14), *A. encheleia* (fenon 17), *A. eucrenophila* (fenon 18), *A. media* (fenon 20), *A. schubertii* (fenon 21) y *A. salmonicida* (fenon 22).

3. La especie *A. veronii* es un taxón heterogéneo que requiere una revisión profunda. Así el biogrupo *veronii* de la especie *A. veronii* está representado en el análisis numérico por un único grupo bien diferenciado (fenon 5), lo que contrasta con la diversidad existente entre las cepas del biogrupo *sobria* de *A. veronii*, las cuales forman parte de un total de 5 grupos fenotípicos distintos (fenones 2, 3, 7, 8 y 9). De hecho, parte de estas cepas recibidas como referencia del taxón *A. veronii* biogrupo *sobria*, concretamente las agrupadas en los fenones 2 y

3, no pertenecen a dicho taxón al presentar niveles de homología genómica inferiores al 50% con la cepa tipo de la especie *A. veroni*.

4. Las especies *A. allosaccharophila* (fenon 10) y *A. encheleia* (fenon 17) han sido respectivamente diferenciadas mediante el estudio numérico de los taxones *A. veronii* y *Aeromonas* sp. DHG11, tal y como originalmente ambas fueron descritas. Es más, muchas de las cepas posteriormente incluidas en la especie *A. encheleia* mediante datos moleculares de perfil AFLP han formado un grupo fenotípico distinto y diferenciado del fenon 17 (*A. encheleia*).

5. Se propone una tabla de diagnóstico para la diferenciación de la mayoría de las especies de *Aeromonas* descritas, basada en 35 pruebas bioquímicas, entre las que destacan por su valor resolutivo, las siguientes: producción de H<sub>2</sub>S a partir de cisteína, oxidación de gluconato, ácido de celobiosa y glicerol, y utilización de L-serina y de L-lactato.

6. El estudio de taxonomía numérica fenotípica realizado y los experimentos de hibridación DNA-DNA efectuados utilizando como referencia, entre otras, la cepa tipo de la especie *A. jandaei* han confirmado la existencia en este taxón de cepas de origen ambiental y de ámbito veterinario, las cuales presentan la capacidad de producir ácido a partir de sacarosa, aspectos todos ellos novedosos en cuanto a la descripción original de *A. jandaei*.



7. Se propone la enmienda de la descripción original de la especie *A. jandaei* efectuada por Carnahan y col. en el año 1992, para así incluir las cepas sacarosa-positivas en dicha especie. Entre los aspectos detallados en la descripción enmendada destacan, por ser recogidos por primera vez, la composición en bases guanina-citosina del DNA de la especie *A. jandaei* la cual oscila entre 58,1-61,1mol%.

## **ANEXOS**

## 1. SOLUCIONES Y TAMPONES.

### 1. – Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Cloruro Sódico	0.85%
Cloruro Potásico	0.02%
Fosfato ácido de Sodio	0.15%
Fosfato ácido de Potasio	0.20%
Agua destilada	100ml
pH 7	
Esterilización a 121°C, 20 min.	

### 2. Soluciones para medio mínimo de fuentes de carbono (Lee y cols., 1979)

#### SOLUC. A (5x)

Cloruro de amonio	2.5%
Nitrato de amonio	0.5%
Sulfato de sodio	1.0%
Fosfato de potasio dibásico	1.5%
Fosfato de potasio monobásico	0.5%
Cloruro de sodio	5%
Agua destilada	100 ml
Esterilizar a 121° C, 20 min.	

#### SOLUC. B (100x)

Sulfato de magnesio hidratado	1%
Agua destilada	100 ml
Esterilizar a 121°C, 20 min.	

---

**SOLUC. C (20x)**

Cloruro de magnesio hidratado	8%
Agua destilada	100 ml
Esterilizar a 121 C, 20 min.	

Las soluciones A, B y C se preparan por separado, mezclándose en condiciones estériles cuando se prepara el medio.

**3. Solución de ácido deoxicólico.**

Deoxicolato sódico (Sigma)	2 gr
Agua destilada	100ml.
pH 7,0.	

**Solución de KOH para GRAM (Fluharty y Packard 1967).**

KOH	3%
Agua destilada.	100ml

**5. EDTA salino, pH 8 (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA)**

EDTA	33.62g
NaCl	8.7 g
Ajustar pH con 250ml aprox de KOH 1M. Se afora hasta 1L con agua destilada teniéndose en cuenta los 250 ml de KOH.	

**6-Perclorato sódico 5M.**

NaClO <sub>4</sub>	70,23g
Agua destilada	100 ml

**7. Solución de SDS.**

---

Dodecil sulfato sódico (SDS)	25g
Agua destilada	100ml

**8-Solución salina de citrato salino (SSC) 20X**

Citrato de sodio	80 g
NaCl	160 g
Agua destilada	1000ml.

**9-Solución salina de citrato salino. 0,1M (SSC)**

SSC (20x)	5 ml
Agua destilada	100 ml.

**10-Solución de RNAsa 50µg/ml.**

Solución RNAsa para 10ml.

RNAsa (Sigma)	0.02 g
NaCl	0.08 g
Agua destilada	10 ml.

Calentar durante 10 min a 80°C. (Ni uno más)

**11-Mezcla de cloroformo-alcohol isoamilico (24 :1) para desproteínización. Para un litro serían (960 : 40)**

**12- Solución de Denhart.**

Ficoll 400	0,02%.
------------	--------

PVP	0,02%.
Albúmina bovina	0,02%.
SSC 2x	100 ml.

### 13-Solución de tinción negativa con Acido fosfotúngstico (AFT):

Solución al 2% ajustada al pH entre 5-7 mediante NaOH. A pHs superiora 7 el colorante es muy inestable.

### 14- Solución de glutaraldehído.

Glutaraldehído	2,5 ml
Tampón fosfato 0.1M pH 7,5	100 ml

### 15- Solución de tetróxido de osmio

Tetróxido de osmio al 1%	1.0 g
Agua destilada	100ml.

### 16- Solución de lisostafina

3000 U/ml en Tris 0.05M, NaCl 0.15 M. pH 7.5.

Almacenar en aliquotas de 200 µl .

### 17- Solución madre de proteinasa K.

Proteinasa K (Sigma, St Louis, MO, P-0390). Solución stock de 50 mg/mL.

Almacenar a -20°C.

**18-Solución de bromuro de etidio.** (1 $\mu$ /Ml): Preparar una solución stock de 5mg/ml. Para usar diluir mezclando 100 $\mu$ l de la solución stock con 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Mantener la solución stock así como las de uso, en botellas cubiertas con papel aluminio, para proteger de la luz solar. Cuando se prepara o manipula debe utilizarse guantes, dado que es un agente carcinógeno y mutagénico, evitar contacto con la piel, así como contacto por inhalación. Desechar como residuo tóxico.

**19- Tampón fosfato sódico 0.1M, pH 7,5**

Fosfato de sodio monobásico 1M	9,5 ml
Fosfato de sodio dibásico 1 M	40.5 ml
Agua destilada	50 ml

**20- Tampón Tris-HCl 0.02M, pH 8**

TRIZMA BASE	2.42 g
Ajustar el pH con ácido clorhídrico concentrado.	
Aforar a 1000 ml	

**21- Tampón EDTA-salino**

NaCl 75 mM, EDTA Na<sub>2</sub> 25 mM, pH 7.5.

Na CL	4.38g
EDTA Na <sub>2</sub>	9.3g.

Disolver en 900 ml de agua destilada, ajustar pH y aforar hasta 1L.  
Esterilización por filtración (0.45 $\mu$ m). Almacenar a 4°C.

**22- Tampón de lisis.**

Bacterias Gram negativas: (1% p/v) *N*-lauryl sarcosina, 0.5 M EDTA, pH 9.5).

*N*-lauryl- sarcosine (Sarcosyl NL 30) 3.3 ml.

EDTA Na<sub>2</sub> 18.6 g.

Añadir los ingredientes a 80 ml de agua destilada, añadir aproximadamente 10 ml de NaOH 10M hasta disolver el EDTA. Ajustar pH y aforar hasta 100 ml. Esterilizar por filtración y almacenar a temperatura ambiente.

**23- Tampón Tris-EDTA.**

(Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.5).

TRIZMA base 1.21g.

EDTA Na<sub>2</sub> 3.72g.

Disolver en 900ml de agua destilada, ajustar pH y aforar hasta 1L. Esterilización por filtración y almacenar a 4°C.

**24- Tampón de reacción 10X:**

Contiene Suero albúmina bovina (BSA) y dithiotrietol (DTT).

Endonucelasa de restricción: *Xba*I

Para estabilizar la reacción, se utilizan 2µl de DTT 0.1M y 2µl de BSA (grado molecular) 10mg/ml.



**25- Tampón Tris-Borato-EDTA**

TBE 0.5X: Tris 44.5mM, Acido bórico 44.5mM, EDTA Na<sub>2</sub> 1mM.

pH 8-8.5. Preparar una solución concentrada 10X y diluir 1/ 20 para uso.

TRIZMA base	108g.
EDTA Na <sub>2</sub>	7.44g.
Acido bórico	55.65g.

Pesar cuidadosamente el ácido bórico en una balanza de precisión cerrada, mezclar con el Tris y el EDTA y disuolver en 1L de agua destilada.

**2-MEDIOS DE CULTIVO.****1- Agua de triptona**

Triptona	1%
Extracto de levadura	0.2%
Agua destilada	100 ml

pH =7

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

**2- Caldo de soja triptica suplementado con sal al 1% (p/v) (TSB-I,****Oxoid)**

Digerido pancreático de caseina	1.1%
Digerido papaico de haba de soja	0.3%
Cloruro de sodio	1%

---

Fosfato de potasio dibásico	0.25%
Glucosa	0.25%
Agua destilada	100 ml
pH= 7.3	
Esterilizar a 121 °C, 20 minutos	

### 3- Caldo glucosado

Peptona bacteriológica	0.5%
Extracto de carne	0.3%
Glucosa	0.5%
Cloruro de sodio	1%
Agua destilada	100 ml
pH = 7.0	
Esterilizar a 115 °C, 30 minutos	

### 4-Caldo gluconato-peptona. (Caldo de Hayne)

Gluconato de sodio (potasio)	40 g/l
Peptona de caseína	1.5 g/l
Fosfato monobásico de potasio	1 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Agua destilada	1000 ml
pH= 7.2	

Esterilizar la solución de gluconato (40 g/20 ml agua) por filtración. El medio restante a 121 °C durante 20 minutos.

Una vez esteril el medio base, añadir la solución esteril de gluconato o esterilizar el medio completamente a 0.7 atmósferas (115 °C) durante 30 minutos.

**5- Caldo malonato**

También se puede preparar con malato ó maleico.

Malonato sódico	3 g/l
Cloruro de sodio	2 g/l
Sulfato amónico	2 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Glucosa	0.25 g/l
Fosfato ácido de potasio	0.6 g/l
Azul de bromotimol	0.025 g/l
Agua destilada	1000 ml

pH = 7

Esterilizar a 1 atmósfera durante 20 minutos.

**6- Caldo para halotolerancia. (STB)**

Triptona	1 %
Cloruro sódico	0 - 3 - 6%
Extracto de levadura	0.3%
Agua destilada	100 ml

pH = 7.2

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

**7- Caldo para la reducción de nitratos**

Triptona	1%
Cloruro de sodio	2%
Nitrato de potasio	0.2%
Agua destilada	100ml.

pH = 7.2

Esterilizar a 121°C, 20 minutos

### **8- Caldo con triptófano para el indol**

Triptona 1%

Triptófano 0.1%

Agua destilada 100ml.

pH = 7.0

Esterilizar a 121°C, 20 minutos

### **9- Caldo de Møeller para decarboxilación de aminoácidos (Difco)**

Peptona 0.5%

Extracto de carne 0.5%

Dextrosa 0.05%

Púrpura de bromocresol 0.001%

Rojo cresol 0.0005%

Piridoxal 0.0005%

L-lisina, L-arginina o L-ornitina 1%

Agua destilada 100 ml.

pH= 6.0

Esterilizar a 115°C, 30 minutos

### **10- Caldo Urea (Pronadisa)**

Urea 2%

Fosfato de potasio monobásico 0.91%

Fosfato de sodio dibásico 0.95%

Extracto de levadura 0.01%

Rojo fenol	0.001%
Agua destilada	100ml.
pH= 6.8	
Esterilización por filtración a través de filtros de nitrocelulosa	(0.22 $\mu$ m)

**11- Agar tiosulfato. citrato-bilis-sacarosa (TCBS) (Oxoid)**

Extracto de levadura	0.5%
Peptona bacteriológica	1%
Tiosulfato de sodio	1%
Citrato de sodio	1%
Bilis de buey	0.8%
Sacarosa	2%
Cloruro de sodio	1%
Citrato férrico	0.1%
Azul de bromotimol	0.004%
Azul de timol	0.004%
Agar bacteriológico	1.4%
Agua destilada	100 ml
pH= 8.6.	
No requiere esterilización	

**12- Agar de soja tríptica, suplementado con sal al 1% (p/v) (TSA-1, oxoid)**

Triptona	1.5%
Soyotona	0.5%
NaCl	1%
Agar bacteriológico	1.5%

---

Agua destilada	100ml
pH= 7.4	
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

**13- Arginina de Thornley (Thornley, 1960)**

Peptona	0.1%
Cloruro de sodio	0.5%
Fosfato de potasio dibásico	0.03%
L-arginina	1%
Rojo fenol	0.001%
Agar	0.3%
Agua destilada	100ml.
pH = 6.8	
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

**14- Medio basal O/F (Difco) (Hugh A. Leifson, 1953)**

Triptona	0.2%
Cloruro de sodio	0.5%
Fosfato de sodio dibásico	0.03%
Azul de bromotimol	0.008%
Agar	0.2%
Agua destilada	100ml.
pH = 6.8	
Esterilizar a 115 °C, 30 minutos	

**15- Agar semi-sólido para VP (Furniss y cols. 1978)**

Triptona	0.7%
----------	------

---

Soyotona	0.5%
Extracto de levadura	0.1%
Glucosa	1%
Cloruro de sodio	1%
Agar	0.3%
Agua destilada	100ml.
pH = 7.0	
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

**16- Gelatina nutritiva**

Peptona	1%
Extracto de carne	0.3%
Gelatina	12%
Cloruro de sodio	0.5%
Agua destilada	100ml.
Disolver los componentes con calentamiento suave	
pH = 7.0	
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

**17- Medio GCF. (Véron y Gasser 1963).**

Bacto - peptone	10g/l
Cloruro potásico	4g/l
Bacto agar	5g/l
Agua destilada	1000 ml
pH 7.2	
Esterilizar a 115°C durante 20 minutos, después enfriar a 45°C y añadir asépticamente 100 ml de la siguiente solución esterilizada por filtración:	

L-Cisteina	1g
Citrato de hierro y amonio	1g
Agua destilada	100ml
Mezclar y esperar solidificación en posición vertical. Inocular por picadura e incubar a 28 °C.	

### 18- Agar Citrato de Simmon (Oxoid)

Sulfato de magnesio	0.02%
Fosfato de amonio hidratado	0.02%
Fosfato de sodio y amonio	0.08%
Citrato de sodio	0.2%
Cloruro de sodio	0.5%
Azul de bromotimol	0.008%
Agar	1.5%
Agua destilada	100ml.
pH= 7	

Esterilizar a 121 C, 20 minutos

### 19- Medio base para la utilización de ácidos orgánicos.

Cloruro sódico	5g/l
Fosfato monobásico de amonio	1g/l
Fosfato dibásico de potasio	1g/l
Sulfato de magnesio hidratado	0.2 g/l
Agar	9 g/l
Agua destilada	1000 ml
Azul de bromotimol	
pH= 6.8	



Esterilizar a 121°C durante 20 min. Disolver en agua el ácido orgánico (2g/l), ajustar el pH y esterilizar por filtración. Añadirlo a la concentración de 2g/l, al medio base.

### 20- Agar Arbutina

Triptona	0.2g
Fosfato dipotásico	0.03g
Cloruro sódico	0.5g
Agar	1.5g
Arbutina	0.5g
Agua destilada	100 ml.

La Arbutina se esterilizará por filtración.

### 21- Medio basal para fuentes de carbono (Lee y cols., 1981)

(Ver apartado I.1. Soluciones): Para preparar 1000 ml de medio:

(200ml)A+ (10ml)B + (50ml)C + (745 ml) H<sub>2</sub>O

Agar purificado (Oxoid)	1%
Substrato (1) Aa, ác. orgánicos, alcoholes	1 g/l
(2) Azúcares	2 g/l
(3) Casaminoácidos (Difco)	1 g/l
(4) Sin substrato	

Esterilización por filtración a través de filtros de nitrocelulosa (0.22 µm)

(1) y (2) Substratos utilizados en las pruebas nutricionales

(3) Control positivo

(4) Control negativo

### 22- Agar SDS

---

TSA	4 g
SDS	0.2 g
Agua destilada	100 ml
pH= 7	
Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.	

**23- Agar Alginato**

TSA	5.51 %
Alginato Sódico	2%
Agua destilada	300 ml.
Esterilizar a 121°C 20 min.	

**24- Agar para la producción de ácido a partir de azúcares**

Peptona	1%
Extracto de carne	0.3%
Cloruro de sodio	1%
Azúcar	1%
Púrpura de bromocresol	0.001%
Agar	1.5%
Agua destilada	100ml.
pH = 7.6	
Esterilizar a 115°C, 30 minutos	

**25- Agar esculina**

Triptona	1%
Esculina	0.1%
Cloruro de sodio	1%

---

Citrato de hierro (III)	0.05%
Agar	1.5%
Agua destilada	100ml.
pH = 7.0	
Esterilizar a 115°C, 10 minutos	

**26- Agar caseina**

“Skim Milk” (Difco)	5%
TSA-1	100ml.

Se prepara por una parte la solución de caseina disuelta en 50 ml de agua destilada, y por separado TSA-1 (2x). Esterilizar a 115 °C, 25 minutos. Se mezclan las dos soluciones cuando alcancen una temperatura aproximada de 50°C.

**27- Agar con yema de huevo**

Yema de huevo estéril	
(“egg-yolk emulsión”, Difco)	5%
TSA-1 estéril	100ml.

Se mezclan cuando el TSA-1 alcance una temperatura aproximada de 50°C.

**28- Agar con elastina (Hsu y cols., 1981)**

Elastina (Sigma E1625)	1%
Triptona	0.2%
Extracto de levadura	0.2%
L-Cisteina	0.03%
Cloruro de sodio	1%
Tampón Tris-HCl 0.02M, pH 8	600ml.

**Cloruro de calcio 0.04M**

La elastina se dispersa en 20 ml de hidróxido de sodio 0.1N, y la mezcla se calienta a 100 °C durante 1 hora, con agitación frecuente. Se ajusta el pH a 8 con ácido clorhídrico 0.1N, y se afora a 400 ml con agua destilada. La solución de elastina se tritura en batidora durante 3 minutos, después se esteriliza a 121 °C, 15 minutos. Los otros componentes se disuelven en 600 ml de tampón Tris-HCl, y se esteriliza a 121 °C, 20 minutos. Las dos soluciones estériles se mezclan antes de verter en placa.

**29- Agar Tween-80**

Tween-80 (Scharlau)	1%
TSA-1	100ml.
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

**30- Agar con almidón**

Almidón soluble	0.2%
TSA-1	100ml.
Esterilizar a 121 °C, 20 minutos	

**3. REACTIVOS Y DISCOS DE LECTURA.**

1. - Reactivo para el método de Gram. sin tinción.

KOH	3g.
Agua destilada	100ml.

2- Discos de O/129, 150 µg (Oxoid)

3- Reactivo para la prueba de la oxidasa

---

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilen-diamina	1%
Agua destilada	100ml.

**4- Reactivo para la catalasa**

Agua oxigenada de 10 volúmenes

**5- Reactivo de Kovac's para la prueba del indol**

Alcohol amílico o isoamílico	150ml.
p-dimetil-aminobenzaldehido	
10ml.	
Ácido clorhídrico concentrado	50ml.

**6- Reactivos para la lectura de la reducción de nitratos**

SOLUC. A

N-1-naftil-etilendiamina	0.02%
Soluc. de ácido clorhídrico 1.5N	100ml.

SOLUC. B

Ácido sulfanílico	1%
Soluc. de ácido clorhídrico 1.5N	100ml.

Mezclar las soluciones A y B (1:1) justo antes de realizar la determinación.

**7- Reactivo para la hidrólisis de Arbutina**

Hidróxido potásico	40%.
--------------------	------

**8- Reactivos para la lectura de la prueba Voges-Proskauer**

SOLUC. A

Naftol	5%
--------	----

---

Alcohol etílico	100ml.
Almacenar en oscuridad	
<b>SOLUC. B</b>	
Hidróxido de potasio	40%
Creatina	0.3%
Agua destilada	100ml.

**9- Reactivo para la prueba de la hidrólisis de almidón**

Iodo	1 gr.
Ioduro de potasio	2 gr.
Aforar a 300 ml con agua destilada	

**10- Reactivo para la oxidación de gluconato. (Reactivo de Benedict)**

Citrato sódico	17,3g
Carbonato sódico	10g
Sulfato de cobre pentahidratado	1,73g.

Disolver los dos primeros componentes en 80 ml de agua destilada, por calentamiento. Filtrar. Diluir con agua destilada ajustando hasta un volumen final de 85ml. Disolver el sulfato de cobre en 10 ml de agua destilada y añadir esta solución a la mezcla de citrato-carbonato, en agitación. Aforar a 100 ml con agua destilada.

**4. COLORANTES Y TINCIONES:****1- Tinción de Gram (Doestch, 1981)**

*Solución de cristal violeta*

**SOLUC. A**

---

Cristal violeta	2 gr.
Alcohol etílico al 95%	20ml.

**SOLUC. B**

Oxalato de amonio	0.8 gr.
Agua destilada	80ml.

Mezclar las dos soluciones a proporción 1:1. Se deja reposar durante 24 horas, y se filtra antes de su uso

*Mordiente*

Iodo	1 gr.
Ioduro de potasio	2 gr.

Aforar a 300 ml con agua destilada

*Solución para decoloración*

Alcohol etílico al 95%

*Colorante de contraste*

Soluc. de safranina O al 2.5% en alcohol etílico al 95%	10ml.
Agua destilada	100ml.

**5. MATRIZ DE DATOS FENOTIPICOS.**

"A sample data matrix to test NTSYSpc

"There are 71 characters (rows) and 154 OTUs (columns)

"Columns and rows are labeled. There are missing values.

1 71L 153L 1 9

PIG MOV GAS ADH LDC ODC GDC IND VP H2S 45 4 42 SAC ARA SAL ARB CEL  
 LAC MEL RAF RHAM MNTOL GLROL MALT GALACT FRUC MAN TRE ARBH  
 ESC ELAS SDS YOLK CAS TW80 GEL TCBS GLUCOX MAL MALE ACE LACT CIT  
 PRO GLICT FUM SUCC GABA ASPA GLUTA GLUCO HIST ARG SER TREO ALA  
 GLUT GLI PRO ARA GLUCS NACE 3% GALAC CITRU LEU ORN CARNO BILIS  
 PUT

CECT 4231 CECT 4229 CECT 4228<sup>T</sup> CECT 4335 24 CECT 4333 CECT 4337 7 8 9 10  
 CECT 4821 CECT 4819 CECT 4816 CECT 4817 CECT 4818 CECT 4813 CECT 4815  
 CECT 4814 CECT 4256<sup>T</sup> CECT 4824 CECT 4825 CECT 4826 CECT 4827 24 25 26 27 28  
 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 CECT 4830 CECT 4831 CECT 4832 CECT 4833 CECT  
 4834 CECT 4838 CECT 4835 CECT 4245<sup>T</sup> CECT 4246 CECT 4248 CECT 4249 CECT  
 4250 CECT 4251 CECT 4252 CECT 837<sup>T</sup> CECT 4257<sup>T</sup> CECT 4258 CECT 4259 CECT  
 4260 CECT 4261 CECT 4255<sup>T</sup> CECT 839<sup>T</sup> 62 CECT 4199<sup>T</sup> 63 CECT 4200 CECT 4220  
 CECT 4247 CECT 4224<sup>T</sup> CECT 4253 CECT 4221 CECT 4222 CECT 4223 CECT 838<sup>T</sup>  
 CECT 4226 CECT 4227 CECT 4232<sup>T</sup> CECT 4233 CECT 4234 CECT 4240<sup>T</sup> CECT 4254  
 CECT 894<sup>T</sup> CECT 4235 88 CECT 4341 87 CECT 4342<sup>T</sup> 89 CECT 4343 90 CECT 4853  
 CECT 4854 CECT 4855 CECT 4856 CECT 4243 CECT 4244 CECT 4486<sup>T</sup> CECT 4487<sup>T</sup>  
 99 100 102 103 104 105 106 CECT 4906 CECT 4902 CECT 4904 CECT 4901 CECT 4903  
 CECT 4907 CECT 4908 CECT 4909 CECT 4910 CECT 4911 CECT 4912 CECT 4933  
 CECT 4934 CECT 4935 CECT 4936 CECT 4937 123 124 125 126 127 128 129 130 131  
 CECT 398<sup>T</sup> 133 134 135 136 137 138A 138B CECT 4985 CECT 4986 CECT 4986 CECT  
 4987 CECT 4988 143 CECT CECT 4995 CECT 5025 CECT 5025 146 CECT 5026 CECT  
 5026 CECT 5027 CECT 5028 CECT 5029 CECT 5030

```
0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
1000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
0111111111110111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111110011110001011111111111111111111111111111111111111111
0011111111011001111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111110010111111111111111111111111111111111111111111111111
0111111111110010000001111111111111111111111111111111111111111111
1111111111110111111111111111111111111111111111111111111111111111
0111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111110001111111111111111111111111111111111111111111111111
1100110011110011111111111111111111111111111111111111111111111111
0000000000001101000000111111111111111111111111111111111111111111
0011110111111111111111111111111111111111111111111111111111111111
```



```
00000000000011000000000000000000000000000000
0000000000000111111000000101000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000010
00000000000000000000000000000000000000000000
100100111000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000000
11111111111111111111111111111111111111111101
111111111011111111111111111111111111101110100
111111111110011111111100111111111111100111111
1111111111111111111111111111111111111111111
111110011111100111100000111110110111111110
01011111101001111110100000000000010001100
00000000000111000000101111100011001000111
000010110101000000011001000000
11111111111111111111111111111111111111111101
11111111111111111111111111111100000010000000
1111111111100111100010111111111111100111111
001111111011001111111111111111111111111111
10000001100000000110000000000010001001000
000000110000000000000100000000100000000000
0000000000000000000000000000000000000000000110100
000000000001000000010001000000
111111111111110100111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111111111110011
11111111111101001100110111111111111100000111
11111110111111111111111111111111111111111111
11111110000010111110000011111011101111000
0001001000000111011011111000111000000100
00000000000001111000001001000010000110111
001110100001110000000001000000
00011111111100000000111011111011101111101
1010111011111111111110111111001111111110000
01111110000001011111111110111111100000111
111111111111110001010001000001
0000011111100000000001110000000000000000000
01000011001100000000111110101111111110000
000000011110000111111100001100000000000110
111011001010111001110110001101
0000000111101000000011110000000000000000000
000000000000001111110100000101111100000000
1111111011100001100110000000000000000000110
11001001101011111110011011111111
0000001111101000000011110000000000000000000
010000001000011111101000001111111111110011
1111111111100001111110000000000000000000110
11001001001011111110011011111111111111111111
00000100000111100001000110100000100001101
```

```
00101100000111111011011111101111001110000
00000001110000101111001100100101100111000
011001101000110000010001000001
0000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000001110000
000000000000000000000000000000000101000000000
10000000000011000000000000000000
000000000000000000000000000000000100000011
00010000000000000000000000000100000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000100000001
000000000000000000000000000000010000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
00000000000000000000000000000000000000000000
01000000000000000000000000000000000000000000
01111110000000000000000000000000000000000000
0000010000000000111000110110010
11111111111111111111111111111111111111111111
111111111111111111111111111111111111111110011
11111111111001111111101111111111111001111111
11111111111111111111101111111111111111111111
1111111111111111111111000011111111111111111111
01111111111111111111111111111001000111110000
0000000000000110000010111111111110001111111
1011111111111110000011001000000
111111111111111110111111111011011111111111111
111111111111111111111111111111111111111111011
1111111111111111111111111111111111111111111111
111111111111111111111111111111111111111111111
1111111111101111111111111111111111111111111111
111111111111111111111111111011111111111111000
1111111111111110010010111111111111111111111111
01111001011000111111111111111111111111111111111
11111111111111111111111111111111111111111111111111
11111111111111111111111110111111111111111111101
11111111111111111111111101111111111111111111111111
11111111111111111111111111111111111111111111111111
0000001111101000000011110000000000000000000000000
0100000010000111111010000011111111111111110011
```

111111111100001111110000000000000000110  
11001001001011111100110111111  
000000111110111100001111000000000000000  
0100000010010111111011111011111111110011  
111111110100001101110000000000100000110  
11001001001011111110110111111  
111101111111000111000011110011001011011  
1101001100000110110100000100100010001111  
00000001000110001100101101100010011000111  
110110010101111000011111000110  
00101000000111101101000010101011001101001  
10001100000001111111000000000000000001100  
00000000000110100000010100100010011111001  
000100010000000000001001000000  
11011011111111011110111111111111001111111  
10111111011101111110001111110110010001011  
11111110111111011100101111111111111000111  
0011111111111111111111111111111111111  
111  
011  
111111111101111111111111111111011011111111  
011  
01100011111011100101111101110111010101110  
11101111000101111111111111111111111111111  
1110  
1101111111011111111011111111111111111111  
11  
11  
111111111111101111111111111111111111111111  
111111111111111110111111111111111111111111  
11111111110101101110000111111111111111101  
0111111111011111111111111111101101110011100  
00000001000111111011101111101111111111111  
111111100011110000011001001010  
11111011111110011110000011111011011111000  
01011111011001110110100000000000010001000  
00000000000111000000101111100011000000111  
000010110101000000011001000000  
11111111111101111111111111111111111111111  
111111111111111111111111111111111110001111  
11111111111111011111111101111111111011111  
1111101111011111111110011111111111111111  
000  
000000000000000001101000000010111010001100  
11111110100100010010000009010100001000100  
0000000000000000111100110010011  
1111111111101111111110110111110101010011  
00000111000001111111111110101111111011101  
011111111111101111111110101100010010111111

```
011010110000110000000111111111
0000001111100010000100000000000000000000
01000000000000000001100000001011001111000
0000000000010001111111000000000011111110
100010010000110000000000000000
0011111100011101111100001111111111101011
10011100000101111101110001000101100101000
0000000000010011111100110111101101111111
101011100100110000011000000000
0000001011000000000000000000000000000000
000001000000000000000000000000010000000000
0000000000000000100011010000000000011110
00101000000000000000000000000000
00000000000000000090000000010010001000000
0100000009000000000100000000000000000000
10000000000101010000010000000010001001001
1000001000010000000111011011111
1111111111111111011111111111111111111011
011111110101010011111111111111111111100
1111111111111111111111111111111111111111
11111111111111111111111111111111
11111111111011110111111111111110111111001
01110101100001110119111011101111011101100
1111111111100101111110111111111111111111
11111119111111111111111111111111
00000010111000000000111000000000000000000
00000001000000000001111111101111110010000
000000011100100111110000000000000000111110
1110110100001111101000000000000000000000
000000000000000100000000000000000000000000
0000000000000000000100000001000000010000
000000000000100110110001101000000000000000
0000000000000000000000000000000000000000
11111011111010011111111111111111101111011
0011001100011111111011111111111111111000
10000001110111911111001191111919111111111
1111111111111100011111111111111111
0111111111101010111111101111111111111011
11010011000111111111111111110111111110011
0100011111111111111111111111111111111111
1111111111111111111111111111111111
00011011111010000100111101101011000100000
00000001000001111110111111101111111110100
11919191111001011111110001100000001000000
1100001100101100011001111111111111
000000111110101010011111000001000000000000
00000100000000000001111110101111110001100
919190011111100111111000000000000011011100
11000001001011000001000000000000000000
```

```
01111011111010111111111111111011001101010
0011001100000111110111111110111111111100
1111111111119101111111111111111100111111
1000101111111111111110111111111
0000001111100010000101100000000000000000
00000000000000000001100000100111101110000
0000000111110001111111000000000000000010
010010010000111001100110001000
0000001111101010000111000000000000000000
000000000000000001101100000100111110010000
00000001111010111111110000100000000111110
100010010010110000000000000000000000000
11111011111010011110111111111111101111011
0011011100010111111111111111111111110100
1000000111011101111111110111111101111111
111110111111110001110111001110
00000011111000100001011000000000000000000
000000000000000000001100000100111111110000
000000000110100111111000000000000001111100
10000000000011000000010000000000000000000
11111111111111111111111111111111111111011
11110011011111111111111111111111111111111
11111111111111111111110111111111111111111
111111111111110111100110111111
000000111110100000000111000000000000000000
000000000000000000000111110101111111110000
000000011110100111111100000000000000000000
000010000010110001110110001101
100110111110101101110111111111011001111011
01110011000101111111111111110111111111100
10101111111111111111111111111111111111111
11111110111111111111011111111111
11111111111111111111111111111111111111111
11111111001011111111111111101111111111100
11010001111111111111111111111111111111111
11111111111111011111111111111111
11111111111111111111111111111111111111111
111111110011111111111111111101111111111111
111111111111111111111111111111111111111111
11111111111111111111111111111111111111111
000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
100000000000110000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
000000000000100110110000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
000000000000000000000000000000000000000000
```



## 6- MATRIZ DE SIMILARIDAD OBTENIDA CON EL COEFICIENTE $S_{SM}$ .

```

"A sample data matrix to test NTSYSpc
"There are 71 characters (rows) and 154 OTUs (columns)
"Columns and rows are labeled. There are missing values.
"   SIMQUAL:   input=C:\Mis documentos\lazara\datex813.NTS,
coeff=SM
" by Cols
3 153L 153 0
CECT 4231 CECT 4229 CECT 4228T CECT 4335 24 CECT 4333 CECT
4337 7 8 9 10 CECT 4821 CECT 4819 CECT 4816 CECT 4817 CECT
4818 CECT 4813 CECT 4815 CECT 4814 CECT 4256T CECT 4824 CECT
4825 CECT 4826 CECT 4827 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
36 37 38 CECT 4830 CECT 4831 CECT 4832 CECT 4833 CECT 4834
CECT 4838 CECT 4835 CECT 4245T CECT 4246 CECT 4248 CECT 4249
CECT 4250 CECT 4251 CECT 4252 CECT 837T CECT 4257T CECT 4258
CECT 4259 CECT 4260 CECT 4261 CECT 4255T CECT 839T 62 CECT
4199T 63 CECT 4200 CECT 4220 CECT 4247 CECT 4224T CECT 4253
CECT 4221 CECT 4222 CECT 4223 CECT 838T CECT 4226 CECT 4227
CECT 4232T CECT 4233 CECT 4234 CECT 4240T CECT 4254 CECT 894T
CECT 4235 88 CECT 4341 87 CECT 4342T 89 CECT 4343 90 CECT
4853 CECT 4854 CECT 4855 CECT 4856 CECT 4243 CECT 4244 CECT
4486T CECT 4487T 99 100 102 103 104 105 106 CECT 4906 CECT
4902 CECT 4904 CECT 4901 CECT 4903 CECT 4907 CECT 4908 CECT
4909 CECT 4910 CECT 4911 CECT 4912 CECT 4933 CECT 4934 CECT
4935 CECT 4936 CECT 4937 123 124 125 126 127 128 129 130 131
CECT 398T 133 134 135 136 137 138A 138B CECT 4985 CECT 4986
CECT 4986 CECT 4987 CECT 4988 143 CECT CECT 4995 CECT 5025
CECT 5025 146 CECT 5026 CECT 5026 CECT 5027 CECT 5028 CECT
5029 CECT 5030

1.0000000
0.9154930 1.0000000
0.8732394 0.9577465 1.0000000
0.9154930 0.9154930 0.9014085 1.0000000
0.8732394 0.9014085 0.9154930 0.9577465 1.0000000
0.8028169 0.8309859 0.8450704 0.8309859 0.8169014
1.0000000
0.7042254 0.7323944 0.7183099 0.7887324 0.7464789
0.6760563 1.0000000
0.7323944 0.7323944 0.7183099 0.7887324 0.7464789
0.6478873 0.9154930 1.0000000
0.7183099 0.7183099 0.6760563 0.7464789 0.7042254
0.6056338 0.9295775 0.9577465 1.0000000
0.6901408 0.7464789 0.7042254 0.7464789 0.7323944
0.6338028 0.9295775 0.9295775 0.9718310 1.0000000

```

0.7042254	0.7605634	0.7183099	0.7605634	0.7464789
0.6478873	0.9154930	0.9436620	0.9577465	0.9859155
1.0000000				
0.7887324	0.7887324	0.8028169	0.7887324	0.8028169
0.8169014	0.5774648	0.6056338	0.5633803	0.5915493
0.6056338	1.0000000			
0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.7746479	0.7887324
0.6619718	0.7605634	0.7887324	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.6760563	1.0000000		
0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.7183099	0.7605634
0.8028169	0.5915493	0.5915493	0.5492958	0.5774648
0.5915493	0.8450704	0.7464789	1.0000000	
0.6760563	0.7323944	0.7464789	0.6760563	0.7183099
0.7605634	0.7183099	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.6338028	0.6760563	0.7323944	1.0000000
0.9014085	0.9014085	0.8873239	0.9014085	0.9154930
0.7887324	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.8169014	0.7183099
1.0000000				
0.7887324	0.8450704	0.8591549	0.8169014	0.8309859
0.7605634	0.6619718	0.6619718	0.6197183	0.6478873
0.6619718	0.7746479	0.7042254	0.7042254	0.7183099
0.8028169	1.0000000			
0.8732394	0.9014085	0.9154930	0.9014085	0.9154930
0.7605634	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.7464789	0.7887324	0.7323944	0.7183099
0.8591549	0.8309859	1.0000000		
0.9428571	0.9428571	0.9285714	0.9428571	0.9285714
0.8285714	0.7285714	0.7571429	0.7142857	0.7142857
0.7285714	0.7857143	0.7714286	0.7428571	0.7000000
0.9285714	0.8428571	0.9285714	1.0000000	
0.7042254	0.7605634	0.8028169	0.7323944	0.7746479
0.7605634	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.6901408	0.7042254	0.7605634	0.8873239
0.7464789	0.7183099	0.7464789	0.7571429	1.0000000
0.6338028	0.7183099	0.6760563	0.6901408	0.7042254
0.6619718	0.7323944	0.7323944	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.6197183	0.7183099	0.6901408	0.6760563
0.6760563	0.7042254	0.6478873	0.6571429	0.6760563
1.0000000				
0.6197183	0.6760563	0.6338028	0.6760563	0.6901408
0.6197183	0.8309859	0.8309859	0.8450704	0.8732394
0.8873239	0.5774648	0.7323944	0.6478873	0.6901408
0.6619718	0.6056338	0.6338028	0.6428571	0.7183099
0.9014085	1.0000000			
0.6478873	0.7042254	0.6619718	0.7042254	0.7183099
0.6478873	0.8309859	0.8309859	0.8450704	0.8732394
0.8873239	0.6056338	0.7042254	0.6478873	0.6901408
0.6901408	0.6338028	0.6619718	0.6714286	0.7183099
0.8450704	0.9436620	1.0000000		



0.7323944	0.7605634	0.7183099	0.7323944	0.7183099
0.7042254	0.7464789	0.7746479	0.7605634	0.7887324
0.8028169	0.6901408	0.8169014	0.7605634	0.6619718
0.7464789	0.6619718	0.7183099	0.7285714	0.6901408
0.8169014	0.8591549	0.8591549	1.0000000	
0.8732394	0.9014085	0.9154930	0.9295775	0.9436620
0.8450704	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.8591549	0.8169014	0.7887324	0.7183099
0.8873239	0.8309859	0.8873239	0.9285714	0.7746479
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.7464789	1.0000000
0.8732394	0.9295775	0.9154930	0.9577465	0.9436620
0.8169014	0.7746479	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.8028169	0.7887324	0.7323944	0.6901408
0.8873239	0.8028169	0.9154930	0.9285714	0.7464789
0.7042254	0.6901408	0.7464789	0.7464789	0.9154930
1.0000000				
0.8591549	0.9154930	0.9295775	0.9436620	0.9577465
0.8309859	0.7605634	0.7605634	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.8169014	0.8309859	0.7746479	0.7323944
0.8732394	0.8169014	0.9295775	0.9142857	0.7887324
0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.7605634	0.9577465
0.9577465	1.0000000			
0.8732394	0.9295775	0.9154930	0.9295775	0.9154930
0.8169014	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.7746479	0.7605634	0.7323944	0.6901408
0.8873239	0.8028169	0.9154930	0.9428571	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.7183099	0.9154930
0.9436620	0.9295775	1.0000000		
0.8732394	0.9014085	0.9154930	0.9577465	1.0000000
0.8169014	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.8028169	0.7887324	0.7605634	0.7183099
0.9154930	0.8309859	0.9154930	0.9285714	0.7746479
0.7042254	0.6901408	0.7183099	0.7183099	0.9436620
0.9436620	0.9577465	0.9154930	1.0000000	
0.8169014	0.8732394	0.8591549	0.8169014	0.8309859
0.8169014	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.8450704	0.7464789
0.8309859	0.8028169	0.8028169	0.8428571	0.8309859
0.7887324	0.7464789	0.7464789	0.7746479	0.8309859
0.8309859	0.8169014	0.8309859	0.8309859	1.0000000
0.8450704	0.8732394	0.8873239	0.9014085	0.9154930
0.7605634	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.6619718
0.8309859	0.7746479	0.9436620	0.9142857	0.7183099
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.7183099	0.9154930
0.9154930	0.9295775	0.9436620	0.9154930	0.8028169
00000				
0.8450704	0.9014085	0.9154930	0.9295775	0.9436620
0.7887324	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944

0.7464789	0.8309859	0.7887324	0.7323944	0.6901408
0.8591549	0.8309859	0.9154930	0.9000000	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.7183099	0.7183099	0.9154930
0.9718310	0.9577465	0.9154930	0.9436620	0.8028169
0.9154930	1.0000000			
0.8169014	0.8450704	0.8591549	0.8450704	0.8591549
0.9014085	0.6619718	0.6338028	0.5915493	0.6197183
0.6338028	0.7746479	0.6760563	0.7887324	0.7183099
0.8309859	0.7464789	0.7746479	0.8428571	0.7746479
0.6760563	0.6338028	0.6619718	0.6901408	0.8591549
0.8309859	0.8450704	0.8309859	0.8591549	0.8591549
0.7746479	0.8028169	1.0000000		
0.8028169	0.8591549	0.8732394	0.8028169	0.8169014
0.8591549	0.6197183	0.6478873	0.6056338	0.6338028
0.6478873	0.8450704	0.6901408	0.8309859	0.7323944
0.8169014	0.7605634	0.7887324	0.8285714	0.7605634
0.6901408	0.6197183	0.6478873	0.6760563	0.8169014
0.8450704	0.8028169	0.8169014	0.8169014	0.8732394
0.7887324	0.8169014	0.8169014	1.0000000	
0.9014085	0.9014085	0.9154930	0.9295775	0.9436620
0.8169014	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.8028169	0.7605634	0.7323944	0.6901408
0.8873239	0.8309859	0.9154930	0.9714286	0.7464789
0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.6901408	0.9436620
0.9154930	0.9295775	0.9436620	0.9436620	0.8028169
0.9436620	0.9154930	0.8309859	0.7887324	1.0000000
0.8450704	0.9014085	0.9154930	0.9295775	0.9718310
0.7887324	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.8028169	0.7887324	0.7605634	0.7183099
0.8873239	0.8028169	0.9154930	0.9000000	0.7746479
0.7042254	0.6901408	0.7464789	0.7183099	0.9154930
0.9718310	0.9577465	0.9154930	0.9718310	0.8309859
0.9154930	0.9718310	0.8309859	0.8450704	0.9154930
1.0000000				
0.9436620	0.9436620	0.9014085	0.9436620	0.9295775
0.8591549	0.7323944	0.7323944	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.8169014	0.7464789	0.7464789	0.7042254
0.9014085	0.8169014	0.8732394	0.9428571	0.7323944
0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.7323944	0.9295775
0.9295775	0.9154930	0.9295775	0.9295775	0.8450704
0.8732394	0.9014085	0.8732394	0.8309859	0.9295775
0.9014085	1.0000000			
0.8732394	0.9014085	0.9154930	0.9014085	0.9154930
0.8169014	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.8309859	0.7887324	0.7605634	0.7183099
0.8591549	0.8028169	0.9154930	0.9285714	0.7746479
0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.7183099	0.9436620
0.9436620	0.9577465	0.9154930	0.9154930	0.8028169
0.9154930	0.9436620	0.8309859	0.8169014	0.9436620
0.9436620	0.9014085	1.0000000		

0.7887324	0.8169014	0.7746479	0.7605634	0.7746479
0.8169014	0.5774648	0.6056338	0.5915493	0.6197183
0.6338028	0.8591549	0.6197183	0.8169014	0.6901408
0.7746479	0.7183099	0.7183099	0.7571429	0.7183099
0.6478873	0.6056338	0.6619718	0.6901408	0.7746479
0.8028169	0.7887324	0.7746479	0.7746479	0.8028169
0.7183099	0.8028169	0.8028169	0.8450704	0.7464789
0.8028169	0.8169014	0.8028169	1.0000000	
0.8169014	0.8732394	0.8591549	0.8450704	0.8309859
0.7605634	0.6619718	0.6901408	0.6478873	0.6760563
0.6901408	0.7746479	0.7042254	0.7605634	0.6619718
0.8309859	0.8028169	0.8309859	0.8714286	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.7464789	0.8309859
0.8591549	0.8450704	0.8591549	0.8309859	0.8309859
0.8028169	0.8591549	0.8028169	0.7887324	0.8309859
0.8309859	0.8450704	0.8309859	0.7746479	1.0000000
0.8028169	0.8028169	0.8169014	0.8309859	0.8450704
0.8591549	0.6478873	0.6478873	0.6056338	0.6338028
0.6478873	0.8169014	0.7183099	0.8028169	0.7042254
0.7887324	0.7605634	0.7887324	0.8285714	0.7605634
0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.7323944	0.9014085
0.8169014	0.8591549	0.8169014	0.8450704	0.8450704
0.8169014	0.8169014	0.9014085	0.8028169	0.8450704
0.8169014	0.8591549	0.8450704	0.7605634	0.8169014
1.0000000				
0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.7464789	0.7605634
0.8028169	0.5915493	0.5915493	0.5492958	0.5774648
0.5915493	0.8450704	0.6338028	0.8309859	0.6478873
0.7323944	0.7605634	0.7323944	0.7428571	0.7042254
0.6619718	0.6197183	0.6760563	0.6760563	0.7605634
0.7887324	0.7746479	0.7605634	0.7605634	0.7887324
0.7323944	0.8169014	0.7605634	0.8028169	0.7605634
0.7887324	0.7746479	0.7887324	0.8450704	0.7887324
0.7746479	1.0000000			
0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.7323944	0.7183099
0.7605634	0.7183099	0.7464789	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.7183099	0.6760563	0.7042254	0.7183099
0.7464789	0.6619718	0.7183099	0.7714286	0.7183099
0.6760563	0.6901408	0.7183099	0.7183099	0.7183099
0.7746479	0.7323944	0.7746479	0.7183099	0.7464789
0.7183099	0.7464789	0.6901408	0.8169014	0.7464789
0.7464789	0.7887324	0.7464789	0.7464789	0.7183099
0.6760563	0.7042254	1.0000000		
0.8309859	0.8591549	0.8169014	0.8309859	0.8450704
0.8028169	0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.8169014	0.7183099	0.8309859	0.7323944
0.8450704	0.7042254	0.7887324	0.8285714	0.7887324
0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.8169014	0.8732394
0.8732394	0.8591549	0.8450704	0.8450704	0.8732394
0.8169014	0.8450704	0.8450704	0.8309859	0.8169014

0.8732394	0.8591549	0.8732394	0.8732394	0.8169014
0.8591549	0.7746479	0.7323944	1.0000000	
0.8873239	0.9154930	0.9014085	0.9154930	0.9014085
0.8028169	0.7042254	0.7042254	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.8169014	0.7746479	0.7464789	0.6760563
0.9014085	0.8169014	0.8732394	0.9428571	0.7323944
0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.7323944	0.9295775
0.9295775	0.8873239	0.9014085	0.9014085	0.8450704
0.8732394	0.9014085	0.8450704	0.8591549	0.9014085
0.9014085	0.9154930	0.9014085	0.7605634	0.8732394
0.8591549	0.7464789	0.7605634	0.8591549	1.0000000
0.7887324	0.8169014	0.8309859	0.7887324	0.8309859
0.8169014	0.6056338	0.6338028	0.5915493	0.6197183
0.6338028	0.9154930	0.6760563	0.8450704	0.6901408
0.8028169	0.7464789	0.7746479	0.7857143	0.7464789
0.6197183	0.5774648	0.6338028	0.6619718	0.8309859
0.8309859	0.8450704	0.8028169	0.8309859	0.8028169
0.7746479	0.8591549	0.8028169	0.8732394	0.8028169
0.8591549	0.8169014	0.8591549	0.9436620	0.7746479
0.7887324	0.8450704	0.7464789	0.8450704	0.7887324
1.0000000				
0.8028169	0.8309859	0.8450704	0.8028169	0.8450704
0.8028169	0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6901408
0.6760563	0.8450704	0.7183099	0.8309859	0.7042254
0.8169014	0.7605634	0.7887324	0.8000000	0.7605634
0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.7042254	0.8450704
0.8169014	0.8591549	0.8169014	0.8450704	0.8450704
0.7887324	0.8169014	0.8169014	0.8309859	0.8169014
0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8732394	0.7605634
0.8028169	0.7746479	0.7042254	0.8309859	0.7746479
0.9295775	1.0000000			
0.8873239	0.9154930	0.8732394	0.8873239	0.8732394
0.8028169	0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7464789
0.7605634	0.7887324	0.7464789	0.7183099	0.6760563
0.8450704	0.7887324	0.8732394	0.9142857	0.7042254
0.6901408	0.7042254	0.7042254	0.7605634	0.9014085
0.9014085	0.8873239	0.9014085	0.8732394	0.8169014
0.9014085	0.9014085	0.7887324	0.8028169	0.9014085
0.8732394	0.9154930	0.9014085	0.7887324	0.8450704
0.8028169	0.7464789	0.7605634	0.8591549	0.8873239
0.7887324	0.7746479	1.0000000		
0.8732394	0.9014085	0.8591549	0.8732394	0.8591549
0.7605634	0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.7887324
0.8028169	0.7464789	0.7605634	0.7323944	0.6619718
0.8309859	0.7464789	0.8873239	0.9000000	0.7183099
0.7323944	0.7464789	0.7464789	0.8028169	0.8591549
0.8873239	0.8732394	0.8591549	0.8591549	0.8309859
0.8873239	0.8591549	0.7464789	0.8169014	0.8591549
0.8591549	0.8732394	0.8591549	0.7464789	0.8309859

0.7887324	0.7042254	0.7746479	0.8450704	0.8732394
0.7464789	0.7605634	0.9295775	1.0000000	
0.7605634	0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.7464789
0.7887324	0.6056338	0.6338028	0.6197183	0.6478873
0.6619718	0.7746479	0.6197183	0.7605634	0.6619718
0.7746479	0.6619718	0.6619718	0.7285714	0.6619718
0.6760563	0.6338028	0.6901408	0.6901408	0.7183099
0.7464789	0.7042254	0.7183099	0.7464789	0.7464789
0.6619718	0.7183099	0.7746479	0.8169014	0.7183099
0.7464789	0.7887324	0.7183099	0.8873239	0.6901408
0.7042254	0.7605634	0.8028169	0.7887324	0.7323944
0.8309859	0.7887324	0.7042254	0.6901408	1.0000000
0.7857143	0.7857143	0.7428571	0.7571429	0.7714286
0.7857143	0.5714286	0.5714286	0.5571429	0.5857143
0.6000000	0.8285714	0.5857143	0.7857143	0.6285714
0.8000000	0.6857143	0.6857143	0.7571429	0.6571429
0.6142857	0.5714286	0.6285714	0.6285714	0.7428571
0.7714286	0.7285714	0.7571429	0.7714286	0.7714286
0.7000000	0.7714286	0.7714286	0.8142857	0.7571429
0.7714286	0.8142857	0.7428571	0.8571429	0.7428571
0.7285714	0.8142857	0.7285714	0.8142857	0.7571429
0.8571429	0.7857143	0.7571429	0.7142857	0.8285714
1.0000000				
0.7887324	0.7887324	0.7464789	0.7605634	0.7746479
0.7887324	0.5774648	0.6056338	0.5915493	0.6197183
0.6338028	0.8591549	0.5915493	0.7887324	0.6056338
0.8028169	0.7464789	0.6901408	0.7571429	0.6338028
0.6197183	0.6056338	0.6619718	0.6619718	0.7464789
0.7746479	0.7323944	0.7464789	0.7746479	0.7464789
0.6901408	0.7746479	0.7464789	0.8169014	0.7464789
0.7746479	0.8169014	0.7464789	0.8873239	0.7464789
0.7042254	0.8450704	0.7464789	0.7887324	0.7605634
0.8591549	0.7887324	0.7887324	0.7464789	0.8309859
0.9142857	1.0000000			
0.7746479	0.8028169	0.7887324	0.8028169	0.8169014
0.8309859	0.7042254	0.7042254	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.8169014	0.7183099	0.8309859	0.7042254
0.8169014	0.7042254	0.7605634	0.8000000	0.7605634
0.7183099	0.7323944	0.7605634	0.7887324	0.8450704
0.8450704	0.8309859	0.8169014	0.8169014	0.8732394
0.7887324	0.8450704	0.8450704	0.8309859	0.7887324
0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8450704	0.8169014
0.8591549	0.8028169	0.7605634	0.9154930	0.8309859
0.8450704	0.8028169	0.8591549	0.8169014	0.7605634
0.7857143	0.7887324	1.0000000		
0.7464789	0.7746479	0.7605634	0.7464789	0.7605634
0.8309859	0.5633803	0.5633803	0.5492958	0.5774648
0.5915493	0.8169014	0.6338028	0.8028169	0.6760563
0.7605634	0.7042254	0.6760563	0.7428571	0.7323944
0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6760563	0.7887324

0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.8169014
0.7042254	0.7605634	0.8450704	0.8309859	0.7323944
0.7605634	0.8028169	0.7605634	0.8732394	0.7323944
0.8028169	0.8309859	0.7042254	0.8591549	0.7746479
0.8169014	0.7464789	0.7746479	0.7323944	0.8169014
0.8714286	0.8732394	0.8591549	1.0000000	
0.7605634	0.8169014	0.8309859	0.8450704	0.8873239
0.7323944	0.7464789	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.7183099	0.9014085	0.7887324	0.6901408
0.8591549	0.7183099	0.8309859	0.8142857	0.7183099
0.7323944	0.7183099	0.7464789	0.7746479	0.8591549
0.8591549	0.9014085	0.8309859	0.8873239	0.7464789
0.8309859	0.8591549	0.7746479	0.7323944	0.8309859
0.8873239	0.8169014	0.8591549	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.7042254	0.7183099	0.7887324	0.7887324
0.7746479	0.7887324	0.7887324	0.7746479	0.7183099
0.6857143	0.6901408	0.7887324	0.7042254	1.0000000
0.7605634	0.8169014	0.8309859	0.8450704	0.8591549
0.7323944	0.7464789	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.7183099	0.9014085	0.7605634	0.6619718
0.8309859	0.7464789	0.8309859	0.8142857	0.6901408
0.7042254	0.6901408	0.7183099	0.7746479	0.8591549
0.8591549	0.9014085	0.8309859	0.8591549	0.7183099
0.8309859	0.8591549	0.7464789	0.7042254	0.8309859
0.8591549	0.8169014	0.8591549	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.7323944	0.7183099	0.7605634	0.7887324
0.7464789	0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.7183099
0.6571429	0.6901408	0.7605634	0.7042254	0.9718310
1.0000000				
0.7605634	0.8169014	0.8309859	0.8450704	0.8591549
0.7323944	0.7464789	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.7183099	0.9014085	0.7605634	0.6619718
0.8309859	0.7464789	0.8309859	0.8142857	0.6901408
0.7042254	0.6901408	0.7183099	0.7746479	0.8591549
0.8591549	0.9014085	0.8309859	0.8591549	0.7183099
0.8309859	0.8591549	0.7464789	0.7042254	0.8309859
0.8591549	0.8169014	0.8591549	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.7323944	0.7183099	0.7605634	0.7887324
0.7464789	0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.7183099
0.6571429	0.6901408	0.7605634	0.7042254	0.9718310
1.0000000	1.0000000			
0.7042254	0.7605634	0.7746479	0.7887324	0.8309859
0.7042254	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.6901408	0.8732394	0.7605634	0.6901408
0.8028169	0.6901408	0.7746479	0.7571429	0.7183099
0.7323944	0.7183099	0.7183099	0.7464789	0.8028169
0.8028169	0.8450704	0.7746479	0.8309859	0.7183099
0.7746479	0.8309859	0.7464789	0.6760563	0.7746479
0.8309859	0.7605634	0.8028169	0.7183099	0.7464789
0.7323944	0.7042254	0.6619718	0.7605634	0.7323944

0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.7183099	0.6901408
0.6571429	0.6619718	0.7887324	0.7042254	0.9436620
0.9154930	0.9154930	1.0000000		
0.7464789	0.8028169	0.8169014	0.8309859	0.8450704
0.6901408	0.7605634	0.8169014	0.7746479	0.8028169
0.8169014	0.7042254	0.8873239	0.7464789	0.6478873
0.8169014	0.7042254	0.8169014	0.8000000	0.7042254
0.7464789	0.7323944	0.7323944	0.7605634	0.8169014
0.8450704	0.8591549	0.8169014	0.8450704	0.7323944
0.8169014	0.8450704	0.7042254	0.7183099	0.8169014
0.8450704	0.8028169	0.8169014	0.6760563	0.7605634
0.7464789	0.7183099	0.7323944	0.7464789	0.7746479
0.7323944	0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.7042254
0.6714286	0.6760563	0.7464789	0.6619718	0.9295775
0.9295775	0.9295775	0.9295775	1.0000000	
0.8028169	0.8309859	0.8169014	0.8309859	0.8450704
0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.7323944	0.8873239	0.7746479	0.6760563
0.8169014	0.7042254	0.8169014	0.8000000	0.6760563
0.7183099	0.7042254	0.7323944	0.7887324	0.8450704
0.8450704	0.8873239	0.8169014	0.8450704	0.7323944
0.8169014	0.8450704	0.7605634	0.7183099	0.8169014
0.8450704	0.8591549	0.8450704	0.7323944	0.7323944
0.7746479	0.7183099	0.7605634	0.7746479	0.7746479
0.7605634	0.7746479	0.8028169	0.7887324	0.7323944
0.7000000	0.7042254	0.7746479	0.7183099	0.9577465
0.9577465	0.9577465	0.9014085	0.9154930	1.0000000
0.6857143	0.7428571	0.7857143	0.7142857	0.7571429
0.7428571	0.7571429	0.7000000	0.6857143	0.7142857
0.7285714	0.6571429	0.6857143	0.7142857	0.8714286
0.7285714	0.7142857	0.7285714	0.7536232	0.9000000
0.6571429	0.7000000	0.7000000	0.6428571	0.7571429
0.7285714	0.7714286	0.7571429	0.7571429	0.7857143
0.7285714	0.7428571	0.7571429	0.7142857	0.7571429
0.7571429	0.7142857	0.7571429	0.6857143	0.7142857
0.7142857	0.6714286	0.7000000	0.7428571	0.7142857
0.7142857	0.7428571	0.7000000	0.7000000	0.6142857
0.6376812	0.6000000	0.7285714	0.6714286	0.7000000
0.6714286	0.6714286	0.7428571	0.6857143	0.6571429
1.0000000				
0.6619718	0.6901408	0.7042254	0.7183099	0.7042254
0.6338028	0.8732394	0.9295775	0.9154930	0.9154930
0.9295775	0.5915493	0.7464789	0.5492958	0.7042254
0.6760563	0.6197183	0.7042254	0.7142857	0.7323944
0.7183099	0.8169014	0.8169014	0.7323944	0.6760563
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7042254	0.6760563
0.7042254	0.7042254	0.6197183	0.6338028	0.7042254
0.7042254	0.6901408	0.7042254	0.5633803	0.6478873
0.6056338	0.5492958	0.7323944	0.6338028	0.6619718
0.5915493	0.6338028	0.7183099	0.7605634	0.6197183

0.5285714	0.5633803	0.6619718	0.5492958	0.7323944
0.7323944	0.7323944	0.7042254	0.7746479	0.7183099
0.7142857	1.0000000			
0.7323944	0.7887324	0.8028169	0.8169014	0.8309859
0.8169014	0.8028169	0.7464789	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.6619718	0.7605634	0.7323944	0.7464789
0.8028169	0.6901408	0.7746479	0.7857143	0.7746479
0.7605634	0.8028169	0.8028169	0.8028169	0.8028169
0.8309859	0.8450704	0.8028169	0.8309859	0.8028169
0.7746479	0.8028169	0.8309859	0.7323944	0.7746479
0.8309859	0.7887324	0.8028169	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.6760563	0.7183099	0.8169014	0.7605634
0.7183099	0.7605634	0.7887324	0.8028169	0.6901408
0.6571429	0.6619718	0.8450704	0.7323944	0.8028169
0.7746479	0.7746479	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7857143	0.7605634	1.0000000		
0.7464789	0.8028169	0.7605634	0.8028169	0.8169014
0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.6478873	0.7464789	0.7183099	0.7323944
0.7887324	0.6760563	0.7605634	0.7714286	0.7323944
0.7746479	0.8169014	0.8169014	0.8169014	0.7887324
0.8169014	0.8309859	0.7887324	0.8169014	0.7887324
0.7605634	0.7887324	0.7887324	0.6901408	0.7605634
0.8169014	0.8028169	0.7887324	0.7323944	0.7323944
0.7464789	0.6619718	0.7042254	0.8309859	0.7464789
0.7042254	0.7464789	0.8028169	0.8169014	0.6760563
0.6714286	0.6760563	0.8309859	0.7183099	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7605634	0.7183099	0.7746479
0.7428571	0.7183099	0.9577465	1.0000000	
0.7323944	0.7887324	0.7464789	0.7887324	0.8028169
0.7605634	0.7746479	0.7183099	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.6901408	0.7605634	0.7323944	0.7183099
0.7746479	0.6901408	0.7464789	0.7571429	0.7183099
0.7887324	0.8309859	0.8028169	0.8309859	0.8028169
0.8028169	0.8169014	0.7746479	0.8028169	0.8028169
0.7746479	0.8028169	0.7746479	0.7042254	0.7464789
0.8028169	0.7887324	0.7746479	0.7464789	0.7464789
0.7605634	0.6760563	0.6901408	0.8450704	0.7605634
0.7183099	0.7323944	0.8450704	0.8309859	0.6619718
0.6857143	0.6901408	0.8732394	0.7605634	0.7746479
0.7464789	0.7464789	0.7746479	0.7042254	0.7605634
0.7428571	0.7042254	0.9436620	0.9577465	1.0000000
0.7605634	0.8169014	0.7746479	0.8169014	0.8309859
0.7887324	0.8028169	0.7464789	0.7605634	0.7887324
0.8028169	0.6619718	0.7605634	0.7323944	0.7464789
0.8028169	0.6901408	0.7746479	0.7857143	0.7464789
0.7887324	0.8309859	0.8309859	0.8309859	0.8028169
0.8309859	0.8450704	0.8028169	0.8309859	0.8028169
0.7746479	0.8028169	0.8028169	0.7042254	0.7746479
0.8309859	0.8169014	0.8028169	0.7464789	0.7464789



0.7605634	0.6760563	0.7183099	0.8450704	0.7605634
0.7183099	0.7605634	0.8169014	0.8309859	0.6901408
0.6857143	0.6901408	0.8450704	0.7323944	0.8028169
0.7746479	0.7746479	0.7746479	0.7323944	0.7887324
0.7571429	0.7323944	0.9718310	0.9859155	0.9718310
1.0000000				
0.7464789	0.8028169	0.7887324	0.8309859	0.8450704
0.7746479	0.7042254	0.6478873	0.6338028	0.6619718
0.6760563	0.7042254	0.7464789	0.7746479	0.6760563
0.8169014	0.6760563	0.7887324	0.8000000	0.7323944
0.6901408	0.6760563	0.7323944	0.7042254	0.8169014
0.8732394	0.8591549	0.8169014	0.8450704	0.7887324
0.7887324	0.8450704	0.8732394	0.7464789	0.7887324
0.8732394	0.8028169	0.8450704	0.7605634	0.7887324
0.8309859	0.7464789	0.6478873	0.8591549	0.8309859
0.7605634	0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.6760563
0.7285714	0.7042254	0.8309859	0.7746479	0.8450704
0.8169014	0.8169014	0.8169014	0.7746479	0.8028169
0.7428571	0.6338028	0.8450704	0.8309859	0.8169014
0.8450704	1.0000000			
0.6760563	0.7323944	0.6901408	0.7042254	0.6901408
0.6760563	0.8309859	0.8309859	0.8450704	0.8732394
0.8873239	0.6056338	0.8169014	0.6760563	0.7183099
0.6901408	0.6056338	0.6901408	0.7000000	0.7464789
0.8169014	0.9154930	0.8873239	0.9154930	0.7183099
0.7183099	0.7323944	0.6901408	0.6901408	0.7464789
0.6901408	0.6901408	0.6619718	0.6478873	0.6619718
0.6901408	0.7042254	0.6901408	0.6338028	0.6901408
0.7042254	0.6197183	0.6901408	0.7605634	0.7042254
0.6056338	0.6478873	0.7323944	0.8028169	0.6338028
0.5714286	0.5774648	0.7605634	0.6478873	0.7464789
0.7464789	0.7464789	0.7464789	0.7605634	0.7605634
0.7285714	0.8169014	0.8028169	0.8169014	0.8309859
0.8309859	0.7042254	1.0000000		
0.6760563	0.7042254	0.6619718	0.6197183	0.6338028
0.6197183	0.5492958	0.5492958	0.5352113	0.5633803
0.5774648	0.6901408	0.6478873	0.7887324	0.5492958
0.7183099	0.6056338	0.6056338	0.6428571	0.5774648
0.7042254	0.6619718	0.6901408	0.7464789	0.6338028
0.6619718	0.6197183	0.6338028	0.6338028	0.7464789
0.6056338	0.6619718	0.6619718	0.7042254	0.6056338
0.6619718	0.6760563	0.6338028	0.7183099	0.7183099
0.6478873	0.7323944	0.6619718	0.7605634	0.6760563
0.6901408	0.6478873	0.6760563	0.6619718	0.7464789
0.7714286	0.7464789	0.7605634	0.7605634	0.6901408
0.6619718	0.6619718	0.7183099	0.7042254	0.7042254
0.5714286	0.5070423	0.6056338	0.6197183	0.6619718
0.6338028	0.6760563	0.6619718	1.0000000	
0.6197183	0.6760563	0.6619718	0.6760563	0.6901408
0.6760563	0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.8169014

0.8309859	0.5774648	0.7323944	0.6478873	0.7183099
0.6619718	0.5774648	0.6338028	0.6428571	0.7183099
0.7887324	0.8309859	0.8309859	0.8309859	0.6901408
0.6901408	0.7042254	0.6619718	0.6901408	0.7464789
0.6619718	0.6619718	0.6901408	0.6478873	0.6338028
0.6901408	0.6760563	0.6619718	0.6338028	0.6619718
0.6760563	0.5633803	0.7183099	0.7605634	0.6478873
0.6056338	0.6478873	0.7042254	0.7464789	0.6619718
0.5714286	0.5774648	0.7605634	0.6760563	0.7464789
0.7183099	0.7183099	0.7183099	0.7042254	0.7323944
0.7000000	0.8169014	0.8309859	0.8169014	0.8309859
0.8309859	0.7042254	0.8309859	0.6338028	1.0000000
0.5915493	0.6197183	0.6056338	0.6478873	0.6338028
0.6197183	0.8309859	0.8028169	0.8169014	0.8169014
0.8028169	0.5211268	0.7323944	0.5633803	0.6338028
0.6056338	0.5492958	0.6338028	0.6428571	0.6619718
0.7323944	0.8309859	0.8028169	0.7746479	0.6619718
0.6619718	0.6760563	0.6338028	0.6338028	0.6619718
0.6619718	0.6338028	0.6056338	0.5352113	0.6338028
0.6338028	0.6197183	0.6619718	0.5211268	0.6056338
0.6197183	0.5352113	0.5774648	0.6478873	0.6197183
0.5211268	0.5915493	0.6760563	0.6901408	0.5211268
0.4571429	0.4647887	0.6760563	0.5352113	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.7183099	0.7042254	0.6760563
0.7000000	0.7887324	0.7464789	0.7323944	0.7464789
0.7464789	0.6478873	0.8591549	0.6056338	0.8028169
1.0000000				
0.5492958	0.6056338	0.5633803	0.6056338	0.6197183
0.5774648	0.7887324	0.7605634	0.7746479	0.8028169
0.8169014	0.5070423	0.6901408	0.5774648	0.6760563
0.5915493	0.5352113	0.5633803	0.5714286	0.7042254
0.7746479	0.8732394	0.8450704	0.7887324	0.6197183
0.6197183	0.6338028	0.5915493	0.6197183	0.6478873
0.5915493	0.5915493	0.5915493	0.5211268	0.5633803
0.6197183	0.6056338	0.5915493	0.5352113	0.5915493
0.5774648	0.5211268	0.5915493	0.6619718	0.5774648
0.5070423	0.5492958	0.6338028	0.6478873	0.5352113
0.4714286	0.5070423	0.6619718	0.5492958	0.6760563
0.6478873	0.6478873	0.7042254	0.6619718	0.6619718
0.7142857	0.7464789	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6338028	0.8450704	0.6478873	0.8450704
0.9014085	1.0000000			
0.5352113	0.5915493	0.6056338	0.6197183	0.6338028
0.6197183	0.8028169	0.7746479	0.7605634	0.7887324
0.8028169	0.4929577	0.7042254	0.5633803	0.6901408
0.6056338	0.5492958	0.5774648	0.5857143	0.7183099
0.7605634	0.8309859	0.8028169	0.7464789	0.6338028
0.6338028	0.6478873	0.6056338	0.6338028	0.6619718
0.6056338	0.6056338	0.6338028	0.5633803	0.5774648
0.6338028	0.5915493	0.6056338	0.5211268	0.5774648

0.5915493	0.5070423	0.6056338	0.6478873	0.5915493
0.5211268	0.5633803	0.6197183	0.6338028	0.5492958
0.4571429	0.4647887	0.6760563	0.5633803	0.6901408
0.6619718	0.6619718	0.7183099	0.6760563	0.6478873
0.7571429	0.7887324	0.7746479	0.7323944	0.7464789
0.7464789	0.6478873	0.8309859	0.6056338	0.8591549
0.9154930	0.9295775	1.0000000		
0.5633803	0.6197183	0.6338028	0.6478873	0.6619718
0.6197183	0.8028169	0.8028169	0.7887324	0.8169014
0.8309859	0.5492958	0.7042254	0.5915493	0.6619718
0.6338028	0.5774648	0.6056338	0.6142857	0.7183099
0.7605634	0.8591549	0.8309859	0.7464789	0.6338028
0.6619718	0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.7183099
0.6338028	0.6619718	0.6338028	0.6197183	0.6056338
0.6619718	0.6197183	0.6056338	0.5774648	0.6901408
0.6197183	0.5633803	0.6338028	0.6760563	0.6197183
0.5774648	0.5915493	0.6760563	0.6901408	0.6056338
0.5714286	0.5492958	0.7323944	0.6197183	0.6901408
0.6619718	0.6619718	0.7183099	0.7042254	0.6478873
0.7142857	0.8169014	0.7746479	0.7323944	0.7746479
0.7464789	0.6478873	0.8309859	0.6338028	0.8591549
0.8591549	0.8450704	0.8873239	1.0000000	
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.7746479	0.7605634
0.6619718	0.8732394	0.8732394	0.8873239	0.9154930
0.9295775	0.6197183	0.7746479	0.6056338	0.6760563
0.7323944	0.6760563	0.7323944	0.7428571	0.7042254
0.8028169	0.8732394	0.8450704	0.7887324	0.7323944
0.7887324	0.7746479	0.7605634	0.7605634	0.7323944
0.7323944	0.7605634	0.6478873	0.6619718	0.7323944
0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.6478873	0.7042254
0.6619718	0.6056338	0.7887324	0.7183099	0.7183099
0.6478873	0.6901408	0.7746479	0.8169014	0.6760563
0.6142857	0.6478873	0.7183099	0.6056338	0.7605634
0.7605634	0.7605634	0.7605634	0.8309859	0.7746479
0.7142857	0.8591549	0.8169014	0.8309859	0.8169014
0.8450704	0.6901408	0.8450704	0.6197183	0.7887324
0.7887324	0.7746479	0.7605634	0.7887324	1.0000000
0.5774648	0.6338028	0.6197183	0.6338028	0.6478873
0.6338028	0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.7183099
0.7323944	0.5633803	0.6901408	0.6619718	0.6478873
0.6478873	0.5070423	0.5915493	0.6000000	0.6760563
0.6619718	0.7605634	0.7605634	0.7605634	0.6478873
0.6478873	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6478873
0.6197183	0.6197183	0.6478873	0.6056338	0.5915493
0.6478873	0.6338028	0.6197183	0.5915493	0.6478873
0.6338028	0.5774648	0.6478873	0.7183099	0.6056338
0.5633803	0.5774648	0.6619718	0.6760563	0.6197183
0.5571429	0.5915493	0.7183099	0.6619718	0.7042254
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6901408
0.6285714	0.6901408	0.7323944	0.7183099	0.7323944

0.7323944	0.6619718	0.7605634	0.6478873	0.8169014
0.7042254	0.7746479	0.7605634	0.7605634	0.6901408
1.0000000				
0.5492958	0.6056338	0.6197183	0.6338028	0.6478873
0.6338028	0.7042254	0.7042254	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.5915493	0.6901408	0.6619718	0.6197183
0.6478873	0.5070423	0.5915493	0.6000000	0.6760563
0.6338028	0.7323944	0.7605634	0.7323944	0.6478873
0.6760563	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6478873
0.6197183	0.6478873	0.6478873	0.6338028	0.5915493
0.6760563	0.6056338	0.6478873	0.5915493	0.6478873
0.6338028	0.6056338	0.6478873	0.7183099	0.6338028
0.5915493	0.5774648	0.6338028	0.6478873	0.6197183
0.5571429	0.5915493	0.7464789	0.6619718	0.7042254
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6619718
0.6285714	0.6901408	0.7323944	0.6901408	0.7042254
0.7042254	0.6901408	0.7323944	0.6478873	0.7887324
0.7042254	0.7464789	0.7605634	0.7605634	0.6619718
0.9718310	1.0000000			
0.5352113	0.5915493	0.5774648	0.5915493	0.6056338
0.5915493	0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.5211268	0.6760563	0.5915493	0.6619718
0.6056338	0.4647887	0.5492958	0.5571429	0.6619718
0.6478873	0.7464789	0.7183099	0.6901408	0.6056338
0.6056338	0.6197183	0.5774648	0.6056338	0.6056338
0.5774648	0.6056338	0.6056338	0.5633803	0.5492958
0.6056338	0.5915493	0.5774648	0.5774648	0.6056338
0.5915493	0.5352113	0.6056338	0.6760563	0.5633803
0.5492958	0.5352113	0.6478873	0.6619718	0.5774648
0.5428571	0.5492958	0.7042254	0.6478873	0.6619718
0.6338028	0.6338028	0.6901408	0.6478873	0.6478873
0.6571429	0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7464789
0.7183099	0.6478873	0.7746479	0.6056338	0.8309859
0.7183099	0.7605634	0.7746479	0.8028169	0.7042254
0.9295775	0.9014085	1.0000000		
0.7323944	0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.7464789
0.6760563	0.6338028	0.6619718	0.6197183	0.6478873
0.6619718	0.6901408	0.6478873	0.6760563	0.7183099
0.7464789	0.7746479	0.7746479	0.7571429	0.7464789
0.6197183	0.5774648	0.6056338	0.6619718	0.7464789
0.7464789	0.7605634	0.7464789	0.7464789	0.7464789
0.7183099	0.7464789	0.6338028	0.7323944	0.7464789
0.7464789	0.7323944	0.7464789	0.6619718	0.7746479
0.7042254	0.6760563	0.6901408	0.7042254	0.7323944
0.7183099	0.7323944	0.7042254	0.7183099	0.6056338
0.6571429	0.6338028	0.6478873	0.5915493	0.6619718
0.6619718	0.6619718	0.6338028	0.7042254	0.6478873
0.7000000	0.6197183	0.6338028	0.6197183	0.6056338
0.6338028	0.6197183	0.6056338	0.6056338	0.6338028

0.6056338	0.5915493	0.6056338	0.6056338	0.6760563
0.5352113	0.5352113	0.4929577	1.0000000	
0.6901408	0.7183099	0.7323944	0.6901408	0.7042254
0.6338028	0.5633803	0.5633803	0.5492958	0.5774648
0.5915493	0.6478873	0.6338028	0.6338028	0.6760563
0.6760563	0.6760563	0.7605634	0.6857143	0.6478873
0.6056338	0.5915493	0.5915493	0.6760563	0.7042254
0.7042254	0.7183099	0.7042254	0.7042254	0.7042254
0.7323944	0.7042254	0.6197183	0.6619718	0.6760563
0.7042254	0.6901408	0.6760563	0.6197183	0.6760563
0.6338028	0.6056338	0.6197183	0.6901408	0.6901408
0.6197183	0.6619718	0.6901408	0.7042254	0.5915493
0.5571429	0.5633803	0.6056338	0.5774648	0.6197183
0.6197183	0.6197183	0.6197183	0.6338028	0.6338028
0.6857143	0.5774648	0.6478873	0.6338028	0.6478873
0.6478873	0.6056338	0.6197183	0.6197183	0.6478873
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.6197183	0.6338028
0.5492958	0.5211268	0.5070423	0.7887324	1.0000000
0.6338028	0.6901408	0.6478873	0.6056338	0.5915493
0.6619718	0.5352113	0.5352113	0.5211268	0.5492958
0.5633803	0.7042254	0.5774648	0.7183099	0.5633803
0.6478873	0.6197183	0.5915493	0.6285714	0.5633803
0.6338028	0.5915493	0.6478873	0.6760563	0.5915493
0.6478873	0.6056338	0.6197183	0.5915493	0.6760563
0.5633803	0.6478873	0.6197183	0.6901408	0.5915493
0.6197183	0.6619718	0.6197183	0.7323944	0.7323944
0.6056338	0.8028169	0.7042254	0.6619718	0.6338028
0.6760563	0.6056338	0.6338028	0.6197183	0.7323944
0.7571429	0.7605634	0.6901408	0.7464789	0.6197183
0.6478873	0.6478873	0.6197183	0.6338028	0.6619718
0.5285714	0.5211268	0.5633803	0.6056338	0.5915493
0.5915493	0.6056338	0.6197183	0.8169014	0.5633803
0.5352113	0.5492958	0.5070423	0.5915493	0.5774648
0.6056338	0.6056338	0.5633803	0.5915493	0.5774648
1.0000000				
0.6338028	0.6901408	0.6478873	0.6056338	0.5915493
0.6619718	0.5352113	0.5352113	0.5211268	0.5492958
0.5633803	0.6760563	0.5774648	0.7183099	0.5633803
0.6478873	0.6197183	0.5915493	0.6285714	0.5633803
0.6338028	0.5915493	0.6197183	0.6760563	0.5915493
0.6197183	0.6056338	0.6197183	0.5915493	0.6760563
0.5633803	0.6197183	0.6197183	0.6619718	0.5915493
0.5915493	0.6619718	0.5915493	0.7042254	0.7323944
0.6056338	0.7746479	0.6760563	0.6338028	0.6056338
0.6478873	0.6056338	0.6338028	0.6197183	0.7042254
0.7285714	0.7323944	0.6619718	0.7183099	0.6197183
0.6478873	0.6478873	0.6197183	0.6338028	0.6619718
0.5285714	0.5211268	0.5633803	0.5774648	0.5915493
0.5915493	0.5774648	0.6197183	0.7887324	0.5915493
0.5633803	0.5774648	0.5352113	0.6197183	0.5774648

0.6619718	0.6338028	0.6197183	0.6197183	0.6056338
0.9436620	1.0000000			
0.7285714	0.7571429	0.7142857	0.7285714	0.7428571
0.6428571	0.6714286	0.7000000	0.6857143	0.7142857
0.7285714	0.6857143	0.7428571	0.7571429	0.6428571
0.7714286	0.6428571	0.7142857	0.7391304	0.6714286
0.8285714	0.8142857	0.8428571	0.9000000	0.7142857
0.7714286	0.7285714	0.7428571	0.7428571	0.7857143
0.7428571	0.7428571	0.6857143	0.7285714	0.7142857
0.7714286	0.7285714	0.7142857	0.7142857	0.7428571
0.7000000	0.7000000	0.7428571	0.8428571	0.7571429
0.6857143	0.6857143	0.7285714	0.7714286	0.7428571
0.6956522	0.6857143	0.7857143	0.7000000	0.7714286
0.7428571	0.7428571	0.7714286	0.7857143	0.7571429
0.6811594	0.6571429	0.7285714	0.7428571	0.7571429
0.7571429	0.7285714	0.8142857	0.8285714	0.7571429
0.7000000	0.7428571	0.7000000	0.7000000	0.7428571
0.7000000	0.7000000	0.6285714	0.6714286	0.6857143
0.7000000	0.6714286	1.0000000		
0.6478873	0.7323944	0.6901408	0.7042254	0.7183099
0.7323944	0.6619718	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.7605634	0.6901408
0.6901408	0.6619718	0.6619718	0.6714286	0.6619718
0.9014085	0.8309859	0.8028169	0.8309859	0.6901408
0.7183099	0.7042254	0.6901408	0.7183099	0.7746479
0.6901408	0.6901408	0.6901408	0.7605634	0.6619718
0.7183099	0.7042254	0.6619718	0.7183099	0.6901408
0.7042254	0.7323944	0.7183099	0.7605634	0.6760563
0.6901408	0.7042254	0.7042254	0.7183099	0.7464789
0.6857143	0.6901408	0.7323944	0.7042254	0.7464789
0.7183099	0.7183099	0.7464789	0.7605634	0.7323944
0.6428571	0.6478873	0.7464789	0.7605634	0.7746479
0.7746479	0.6760563	0.7746479	0.7464789	0.7464789
0.6901408	0.7323944	0.6901408	0.6901408	0.7605634
0.6760563	0.6478873	0.6056338	0.6619718	0.6478873
0.7042254	0.7042254	0.8714286	1.0000000	
0.6956522	0.7246377	0.6811594	0.7101449	0.7246377
0.6956522	0.6521739	0.6811594	0.6666667	0.6956522
0.7101449	0.7101449	0.6956522	0.7826087	0.6666667
0.7391304	0.6086957	0.6666667	0.6911765	0.6666667
0.8405797	0.8260870	0.7971014	0.8550725	0.7101449
0.7246377	0.7101449	0.7101449	0.7246377	0.7536232
0.6956522	0.6956522	0.6811594	0.7246377	0.6811594
0.7246377	0.7246377	0.6811594	0.7391304	0.7101449
0.6956522	0.7246377	0.7391304	0.8115942	0.6956522
0.7101449	0.7101449	0.7246377	0.7246377	0.7681159
0.7352941	0.7391304	0.7536232	0.7246377	0.7536232
0.7246377	0.7246377	0.7536232	0.7681159	0.7391304
0.6470588	0.6376812	0.7391304	0.7536232	0.7681159
0.7681159	0.6811594	0.7681159	0.7971014	0.7391304

0.6811594	0.7246377	0.6811594	0.6811594	0.7536232
0.6811594	0.6521739	0.6086957	0.6666667	0.6666667
0.7246377	0.7246377	0.8985507	0.9420290	1.0000000
0.6619718	0.7183099	0.6760563	0.6901408	0.7042254
0.7183099	0.6478873	0.6760563	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.7746479	0.6760563
0.7042254	0.6478873	0.6478873	0.6571429	0.6478873
0.8873239	0.8169014	0.7887324	0.8450704	0.6760563
0.7042254	0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.7605634
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.7464789	0.6478873
0.7042254	0.6901408	0.6478873	0.7323944	0.6760563
0.6901408	0.7183099	0.7042254	0.7746479	0.6619718
0.7042254	0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.7605634
0.7000000	0.7042254	0.7183099	0.6901408	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.7183099
0.6285714	0.6338028	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6619718	0.7605634	0.7605634	0.7323944
0.6760563	0.7183099	0.6760563	0.6760563	0.7464789
0.6619718	0.6338028	0.5915493	0.6760563	0.6619718
0.6901408	0.6901408	0.8857143	0.9859155	0.9565217
1.0000000				
0.6956522	0.7246377	0.6811594	0.7101449	0.7246377
0.6956522	0.6521739	0.6811594	0.6666667	0.6956522
0.7101449	0.7101449	0.6956522	0.7826087	0.6666667
0.7391304	0.6086957	0.6666667	0.6911765	0.6666667
0.8405797	0.8260870	0.7971014	0.8550725	0.7101449
0.7246377	0.7101449	0.7101449	0.7246377	0.7536232
0.6956522	0.6956522	0.6811594	0.7246377	0.6811594
0.7246377	0.7246377	0.6811594	0.7391304	0.7101449
0.6956522	0.7246377	0.7391304	0.8115942	0.6956522
0.7101449	0.7101449	0.7246377	0.7246377	0.7681159
0.7352941	0.7391304	0.7536232	0.7246377	0.7536232
0.7246377	0.7246377	0.7536232	0.7681159	0.7391304
0.6470588	0.6376812	0.7391304	0.7536232	0.7681159
0.7681159	0.6811594	0.7681159	0.7971014	0.7391304
0.6811594	0.7246377	0.6811594	0.6811594	0.7536232
0.6811594	0.6521739	0.6086957	0.6666667	0.6666667
0.7246377	0.7246377	0.8985507	0.9420290	1.0000000
0.9565217	1.0000000			
0.6760563	0.7323944	0.6901408	0.7323944	0.7464789
0.7042254	0.6619718	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.7605634	0.6619718
0.7183099	0.6056338	0.6901408	0.7000000	0.6619718
0.8450704	0.8309859	0.8028169	0.8309859	0.7183099
0.7464789	0.7323944	0.7183099	0.7464789	0.7464789
0.7183099	0.7183099	0.6901408	0.7323944	0.6901408
0.7464789	0.7323944	0.6901408	0.7183099	0.7183099
0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.7887324	0.7042254
0.6901408	0.6760563	0.7323944	0.7464789	0.7464789
0.7142857	0.7183099	0.7605634	0.7323944	0.7746479

0.7464789	0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.7605634
0.6428571	0.6478873	0.7464789	0.7605634	0.7746479
0.7746479	0.7042254	0.7746479	0.7746479	0.7464789
0.6901408	0.7323944	0.6901408	0.6901408	0.7605634
0.7042254	0.6760563	0.6338028	0.6338028	0.6478873
0.7323944	0.7323944	0.8857143	0.9436620	0.9855072
0.9295775	0.9855072	1.0000000		
0.6857143	0.7428571	0.7000000	0.7285714	0.7428571
0.7142857	0.6571429	0.6857143	0.6714286	0.7000000
0.7142857	0.7000000	0.7000000	0.7714286	0.6714286
0.7285714	0.6142857	0.6857143	0.7101449	0.6714286
0.8428571	0.8285714	0.8000000	0.8285714	0.7285714
0.7428571	0.7285714	0.7285714	0.7428571	0.7571429
0.7142857	0.7142857	0.7000000	0.7428571	0.7000000
0.7428571	0.7428571	0.7000000	0.7285714	0.7285714
0.7142857	0.7428571	0.7571429	0.8000000	0.7142857
0.7000000	0.6857143	0.7428571	0.7428571	0.7571429
0.7246377	0.7285714	0.7714286	0.7428571	0.7714286
0.7428571	0.7428571	0.7714286	0.7857143	0.7571429
0.6521739	0.6428571	0.7428571	0.7571429	0.7714286
0.7714286	0.7000000	0.7714286	0.7857143	0.7428571
0.6857143	0.7285714	0.6857143	0.6857143	0.7571429
0.7000000	0.6714286	0.6285714	0.6428571	0.6428571
0.7428571	0.7428571	0.8840580	0.9428571	0.9855072
0.9285714	0.9855072	1.0000000	1.0000000	
0.6901408	0.7464789	0.7323944	0.7183099	0.7042254
0.7183099	0.8169014	0.7887324	0.8028169	0.8309859
0.8450704	0.6197183	0.8028169	0.6901408	0.7323944
0.7042254	0.6197183	0.7042254	0.7142857	0.7605634
0.8028169	0.8732394	0.8450704	0.9014085	0.7323944
0.7323944	0.7464789	0.7042254	0.7042254	0.7605634
0.7042254	0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6760563
0.7042254	0.7183099	0.7042254	0.6478873	0.7042254
0.7183099	0.6338028	0.7323944	0.7746479	0.7183099
0.6197183	0.6619718	0.7464789	0.8169014	0.6760563
0.5857143	0.5915493	0.7746479	0.6901408	0.7323944
0.7323944	0.7323944	0.7323944	0.7464789	0.7464789
0.7428571	0.8028169	0.8450704	0.8309859	0.8450704
0.8450704	0.7183099	0.9577465	0.6760563	0.8450704
0.8169014	0.8028169	0.8169014	0.8169014	0.8309859
0.7746479	0.7464789	0.7887324	0.6197183	0.6619718
0.6338028	0.6338028	0.8000000	0.7605634	0.7536232
0.7464789	0.7536232	0.7605634	0.7571429	1.0000000
0.6478873	0.7042254	0.6619718	0.6760563	0.6901408
0.6478873	0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.8169014
0.8309859	0.6056338	0.7887324	0.7042254	0.6901408
0.6901408	0.6056338	0.6619718	0.6714286	0.7183099
0.8450704	0.9154930	0.8873239	0.9154930	0.6901408
0.6901408	0.7042254	0.6619718	0.6901408	0.7464789
0.6619718	0.6619718	0.6619718	0.6478873	0.6338028



0.6901408	0.6760563	0.6619718	0.6338028	0.6901408
0.6760563	0.6197183	0.6619718	0.7605634	0.6760563
0.6056338	0.6478873	0.7042254	0.7746479	0.6338028
0.5714286	0.6056338	0.7605634	0.6478873	0.7464789
0.7183099	0.7183099	0.7746479	0.7605634	0.7323944
0.7285714	0.7605634	0.8028169	0.8169014	0.8309859
0.8309859	0.7042254	0.9436620	0.7183099	0.8309859
0.8309859	0.8732394	0.8309859	0.8028169	0.8169014
0.7605634	0.7323944	0.7464789	0.6056338	0.6197183
0.6197183	0.6197183	0.8714286	0.8309859	0.8260870
0.8169014	0.8260870	0.8309859	0.8285714	0.9295775
1.0000000				
0.6619718	0.7183099	0.6760563	0.6901408	0.7042254
0.6619718	0.7887324	0.7887324	0.8028169	0.8309859
0.8450704	0.6197183	0.7746479	0.6901408	0.7042254
0.6760563	0.6197183	0.6760563	0.6857143	0.7605634
0.8309859	0.9295775	0.9014085	0.9014085	0.7042254
0.7042254	0.7183099	0.6760563	0.7042254	0.7605634
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6478873
0.7042254	0.6901408	0.6760563	0.6478873	0.7042254
0.6901408	0.6338028	0.6478873	0.7746479	0.6901408
0.6197183	0.6619718	0.7183099	0.7887324	0.6197183
0.5857143	0.6197183	0.7464789	0.6619718	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.7183099	0.7183099
0.7428571	0.7746479	0.7887324	0.8028169	0.8169014
0.8169014	0.7183099	0.9577465	0.6760563	0.8169014
0.8169014	0.8591549	0.8169014	0.8169014	0.8028169
0.7746479	0.7464789	0.7605634	0.5915493	0.6056338
0.6056338	0.6056338	0.8285714	0.7887324	0.7826087
0.7746479	0.7826087	0.7887324	0.7857143	0.9154930
0.9577465	1.0000000			
0.6338028	0.6901408	0.6478873	0.6619718	0.6760563
0.6619718	0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.8028169
0.8169014	0.6197183	0.7464789	0.7183099	0.7323944
0.6760563	0.5915493	0.6478873	0.6571429	0.7323944
0.8028169	0.9014085	0.8732394	0.8732394	0.6478873
0.6760563	0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.7323944
0.6478873	0.6478873	0.6197183	0.6901408	0.6197183
0.6760563	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6760563
0.6338028	0.6901408	0.7042254	0.7183099	0.6619718
0.6197183	0.6338028	0.6901408	0.7323944	0.6760563
0.6142857	0.6478873	0.7183099	0.6338028	0.7042254
0.6760563	0.6760563	0.7042254	0.7183099	0.6901408
0.6857143	0.7464789	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6338028	0.9014085	0.6760563	0.7605634
0.7605634	0.8028169	0.7605634	0.7887324	0.7746479
0.7464789	0.7183099	0.7042254	0.5915493	0.6056338
0.6619718	0.6619718	0.8285714	0.8450704	0.8405797
0.8309859	0.8405797	0.8450704	0.8428571	0.8591549
0.9014085	0.9154930	1.0000000		

0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.7464789	0.7605634
0.6338028	0.6760563	0.7042254	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.6760563	0.6619718	0.6338028	0.6760563
0.7323944	0.7605634	0.7605634	0.7857143	0.7605634
0.6056338	0.6197183	0.6478873	0.6478873	0.7605634
0.7605634	0.7746479	0.7887324	0.7605634	0.7605634
0.7605634	0.7887324	0.6478873	0.6901408	0.7887324
0.7605634	0.7464789	0.7605634	0.6478873	0.8169014
0.6901408	0.6901408	0.7042254	0.6901408	0.7464789
0.7042254	0.7183099	0.7464789	0.7323944	0.5633803
0.6571429	0.6197183	0.6901408	0.6056338	0.6760563
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.7183099	0.6619718
0.7857143	0.6619718	0.6478873	0.6338028	0.6478873
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.6197183	0.6478873
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.6760563	0.6901408
0.5774648	0.5774648	0.5633803	0.9014085	0.7464789
0.6056338	0.6338028	0.6857143	0.6197183	0.6231884
0.6056338	0.6231884	0.6197183	0.6285714	0.6619718
0.6478873	0.6338028	0.6056338	1.0000000	
0.6857143	0.7285714	0.7142857	0.6714286	0.6857143
0.5714286	0.6285714	0.6285714	0.6428571	0.6714286
0.6857143	0.6428571	0.6714286	0.6000000	0.6571429
0.6857143	0.6857143	0.7142857	0.6956522	0.6571429
0.5857143	0.6285714	0.6571429	0.6285714	0.6857143
0.7142857	0.7000000	0.6857143	0.6857143	0.6714286
0.6571429	0.7428571	0.5857143	0.6571429	0.6857143
0.7142857	0.7142857	0.7142857	0.6428571	0.7428571
0.6285714	0.6857143	0.6142857	0.6714286	0.7000000
0.6714286	0.6571429	0.7000000	0.7142857	0.5571429
0.6666667	0.6428571	0.6571429	0.6285714	0.6285714
0.6285714	0.6285714	0.6285714	0.6714286	0.6571429
0.6521739	0.6428571	0.6285714	0.6428571	0.6571429
0.6571429	0.6428571	0.6857143	0.6142857	0.6285714
0.6000000	0.5857143	0.5714286	0.6571429	0.7000000
0.5571429	0.5571429	0.6285714	0.7714286	0.6714286
0.6285714	0.6285714	0.6086957	0.5428571	0.5441176
0.5285714	0.5441176	0.5428571	0.5507246	0.6714286
0.6285714	0.6714286	0.6142857	0.7857143	1.0000000
0.8450704	0.9014085	0.8591549	0.9014085	0.9154930
0.7605634	0.7183099	0.7183099	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.7464789	0.7605634	0.7323944	0.6901408
0.8591549	0.7464789	0.8591549	0.8857143	0.7183099
0.7323944	0.7183099	0.7183099	0.7464789	0.8873239
0.9154930	0.9014085	0.9154930	0.9154930	0.8309859
0.9154930	0.8873239	0.8028169	0.8169014	0.8873239
0.9154930	0.9014085	0.8591549	0.7746479	0.8028169
0.7887324	0.7042254	0.7464789	0.8732394	0.8732394
0.7746479	0.7887324	0.9014085	0.8873239	0.7183099
0.7571429	0.7464789	0.8169014	0.7605634	0.8309859
0.8028169	0.8028169	0.7746479	0.7887324	0.8169014

0.7285714	0.6760563	0.8028169	0.8169014	0.8309859
0.8309859	0.8169014	0.7183099	0.6619718	0.7183099
0.6338028	0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.7605634
0.6760563	0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.7042254
0.5915493	0.5915493	0.8000000	0.7464789	0.7536232
0.7323944	0.7536232	0.7746479	0.7714286	0.7323944
0.7183099	0.7323944	0.7042254	0.7323944	0.6571429
1.0000000				
0.7714286	0.8000000	0.8428571	0.7714286	0.8142857
0.8428571	0.6428571	0.6142857	0.5714286	0.6000000
0.6142857	0.7714286	0.7428571	0.8142857	0.8285714
0.7857143	0.7571429	0.8142857	0.7971014	0.8428571
0.6285714	0.6142857	0.6142857	0.6714286	0.8142857
0.7857143	0.8285714	0.7857143	0.8142857	0.8142857
0.7571429	0.8142857	0.8428571	0.8142857	0.7857143
0.8142857	0.8000000	0.8142857	0.8000000	0.7857143
0.8000000	0.7857143	0.7142857	0.8000000	0.7714286
0.8285714	0.7857143	0.7714286	0.7285714	0.7142857
0.7391304	0.7142857	0.8285714	0.8000000	0.7571429
0.7285714	0.7285714	0.7857143	0.7142857	0.7428571
0.8260870	0.6000000	0.7857143	0.7428571	0.7571429
0.7571429	0.7714286	0.6714286	0.6428571	0.6428571
0.5857143	0.5714286	0.6142857	0.6428571	0.6285714
0.6285714	0.6285714	0.6428571	0.7000000	0.6714286
0.6428571	0.6428571	0.6666667	0.6571429	0.6764706
0.6428571	0.6764706	0.6857143	0.6956522	0.7142857
0.6714286	0.6857143	0.6714286	0.6857143	0.6811594
0.7571429	1.0000000			
0.5492958	0.6056338	0.5915493	0.6338028	0.6478873
0.5774648	0.8169014	0.7887324	0.7746479	0.8028169
0.8169014	0.4788732	0.6901408	0.5492958	0.7042254
0.6197183	0.5633803	0.6197183	0.6142857	0.6760563
0.7464789	0.8450704	0.8169014	0.7323944	0.6197183
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.6478873	0.6760563
0.6478873	0.6197183	0.5915493	0.5492958	0.6197183
0.6478873	0.6056338	0.5915493	0.5070423	0.5633803
0.5774648	0.5211268	0.6197183	0.6338028	0.6056338
0.5070423	0.5492958	0.6338028	0.6478873	0.5352113
0.4857143	0.4788732	0.6619718	0.5211268	0.6760563
0.6478873	0.6478873	0.7042254	0.6901408	0.6338028
0.7428571	0.8028169	0.7323944	0.7183099	0.7323944
0.7323944	0.6338028	0.8169014	0.5915493	0.7887324
0.8450704	0.8591549	0.8732394	0.8169014	0.7746479
0.6619718	0.6619718	0.7042254	0.5915493	0.6056338
0.4929577	0.4929577	0.7428571	0.7042254	0.6956522
0.6901408	0.6956522	0.7042254	0.7000000	0.7746479
0.8169014	0.8028169	0.7746479	0.6338028	0.6142857
0.6760563	0.6000000	1.0000000		
0.5633803	0.6197183	0.6056338	0.6478873	0.6338028
0.6197183	0.8591549	0.8028169	0.8169014	0.8450704

0.8309859	0.5211268	0.7323944	0.5633803	0.6901408
0.6056338	0.5492958	0.6056338	0.6142857	0.6901408
0.7323944	0.8309859	0.8028169	0.7746479	0.6619718
0.6619718	0.6760563	0.6338028	0.6338028	0.6619718
0.6338028	0.6338028	0.6056338	0.5352113	0.6056338
0.6338028	0.6197183	0.6338028	0.5211268	0.5774648
0.6197183	0.5352113	0.6056338	0.6478873	0.6197183
0.5211268	0.5915493	0.6478873	0.6619718	0.5211268
0.4571429	0.4647887	0.6760563	0.5352113	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.6901408	0.6760563	0.6760563
0.7000000	0.8169014	0.7464789	0.7323944	0.7464789
0.7464789	0.6478873	0.8591549	0.5492958	0.8028169
0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8028169	0.7605634
0.6760563	0.6760563	0.7183099	0.5492958	0.5633803
0.5070423	0.5070423	0.6714286	0.6619718	0.6521739
0.6478873	0.6521739	0.6619718	0.6571429	0.8169014
0.8028169	0.8169014	0.7605634	0.5915493	0.6000000
0.6338028	0.5857143	0.9014085	1.0000000	
0.6056338	0.6619718	0.6478873	0.6901408	0.6760563
0.6619718	0.8450704	0.8169014	0.8028169	0.8309859
0.8450704	0.6197183	0.7183099	0.6338028	0.6760563
0.6197183	0.6197183	0.6478873	0.6571429	0.7605634
0.7746479	0.8732394	0.8450704	0.8169014	0.7042254
0.7042254	0.7183099	0.6760563	0.6760563	0.7323944
0.6760563	0.6760563	0.6478873	0.6056338	0.6478873
0.6760563	0.6619718	0.6760563	0.5915493	0.7042254
0.6901408	0.6338028	0.6478873	0.7183099	0.6619718
0.5915493	0.6338028	0.6901408	0.7323944	0.5633803
0.5285714	0.5633803	0.7183099	0.6056338	0.6760563
0.6760563	0.6760563	0.6760563	0.6901408	0.6619718
0.7428571	0.8028169	0.7605634	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6901408	0.8732394	0.6197183	0.8450704
0.8732394	0.8873239	0.8732394	0.8450704	0.8028169
0.8028169	0.8028169	0.7887324	0.6760563	0.6338028
0.5774648	0.6056338	0.7142857	0.7042254	0.6956522
0.6901408	0.6956522	0.7042254	0.7000000	0.8591549
0.8450704	0.8873239	0.8028169	0.7183099	0.6714286
0.6760563	0.6285714	0.8028169	0.8450704	1.0000000
0.4507042	0.5070423	0.5211268	0.5352113	0.5492958
0.5352113	0.7183099	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.4366197	0.6197183	0.5352113	0.6619718
0.5492958	0.4647887	0.5211268	0.5000000	0.6901408
0.6478873	0.7464789	0.7183099	0.6619718	0.5492958
0.5492958	0.5633803	0.5211268	0.5492958	0.6056338
0.5211268	0.5211268	0.5492958	0.5070423	0.4929577
0.5492958	0.5070423	0.5211268	0.4647887	0.5211268
0.5352113	0.4788732	0.5492958	0.5915493	0.5070423
0.4647887	0.5070423	0.5352113	0.5774648	0.4929577
0.4285714	0.4366197	0.6197183	0.5352113	0.6056338
0.5774648	0.5774648	0.6338028	0.6197183	0.5633803

0.6714286	0.7323944	0.6901408	0.6478873	0.6619718
0.6619718	0.5915493	0.7464789	0.5774648	0.8028169
0.8028169	0.8450704	0.8591549	0.8028169	0.7042254
0.7605634	0.7605634	0.8028169	0.5774648	0.5915493
0.4788732	0.5352113	0.6142857	0.6056338	0.5942029
0.5915493	0.5942029	0.6056338	0.6000000	0.7605634
0.7464789	0.7323944	0.6760563	0.5915493	0.6285714
0.5492958	0.5571429	0.8450704	0.8309859	0.8169014
1.0000000				
0.4788732	0.5352113	0.5492958	0.5633803	0.5774648
0.5633803	0.7464789	0.7464789	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.4647887	0.6760563	0.5633803	0.6901408
0.5774648	0.4929577	0.5492958	0.5285714	0.6901408
0.7042254	0.8028169	0.7746479	0.7183099	0.5774648
0.5774648	0.5915493	0.5492958	0.5774648	0.6338028
0.5492958	0.5492958	0.5774648	0.5352113	0.5211268
0.5774648	0.5352113	0.5492958	0.4929577	0.5492958
0.5633803	0.5070423	0.5774648	0.6197183	0.5352113
0.4929577	0.5352113	0.5633803	0.6056338	0.5211268
0.4571429	0.4647887	0.6478873	0.5633803	0.6619718
0.6338028	0.6338028	0.6619718	0.6478873	0.6197183
0.6714286	0.7887324	0.7183099	0.6760563	0.6901408
0.6901408	0.6197183	0.8028169	0.5774648	0.8591549
0.8309859	0.8450704	0.8873239	0.8591549	0.7042254
0.7605634	0.7605634	0.8028169	0.5774648	0.5915493
0.5070423	0.5352113	0.6428571	0.6338028	0.6231884
0.6197183	0.6231884	0.6338028	0.6285714	0.7887324
0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.5915493	0.6571429
0.5774648	0.5857143	0.8732394	0.8873239	0.8450704
0.9436620	1.0000000			
0.6901408	0.7464789	0.7042254	0.7464789	0.7323944
0.6619718	0.8732394	0.9014085	0.9154930	0.9436620
0.9295775	0.6478873	0.7746479	0.6338028	0.7042254
0.7042254	0.6197183	0.7042254	0.7142857	0.7042254
0.7464789	0.8450704	0.8169014	0.7887324	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.7323944	0.7042254
0.7323944	0.7323944	0.6197183	0.6901408	0.7042254
0.7323944	0.7464789	0.7042254	0.6478873	0.6760563
0.6619718	0.6056338	0.7887324	0.7183099	0.7183099
0.6478873	0.6901408	0.7746479	0.7887324	0.6760563
0.6142857	0.6478873	0.7183099	0.6056338	0.7605634
0.7605634	0.7605634	0.7323944	0.8028169	0.7746479
0.6857143	0.8591549	0.7042254	0.7183099	0.7323944
0.7323944	0.6338028	0.8450704	0.5915493	0.7887324
0.7887324	0.7746479	0.7605634	0.7887324	0.8591549
0.7464789	0.7183099	0.7323944	0.6197183	0.6056338
0.5774648	0.5774648	0.7285714	0.7323944	0.7391304
0.7183099	0.7391304	0.7605634	0.7571429	0.8028169
0.7887324	0.8028169	0.8309859	0.6619718	0.6142857

0.7605634	0.6142857	0.7746479	0.8169014	0.8028169
0.6760563	0.7323944	1.0000000		
0.4929577	0.5492958	0.5633803	0.5492958	0.5915493
0.5492958	0.5915493	0.5633803	0.5774648	0.6056338
0.5915493	0.5352113	0.4647887	0.5211268	0.5915493
0.5070423	0.5070423	0.5352113	0.5285714	0.6478873
0.5492958	0.6197183	0.6197183	0.5633803	0.5352113
0.5633803	0.5774648	0.5633803	0.5915493	0.5633803
0.5633803	0.5915493	0.5352113	0.5211268	0.5633803
0.5915493	0.5492958	0.5352113	0.5633803	0.6197183
0.5211268	0.5774648	0.5633803	0.5774648	0.4929577
0.5633803	0.5774648	0.5774648	0.5633803	0.5070423
0.5428571	0.5352113	0.5774648	0.5211268	0.5070423
0.4788732	0.4788732	0.5352113	0.5211268	0.4929577
0.6428571	0.5774648	0.5915493	0.6056338	0.5915493
0.5915493	0.5211268	0.5633803	0.5070423	0.6197183
0.5915493	0.6619718	0.6197183	0.6760563	0.5492958
0.6056338	0.5774648	0.5915493	0.5915493	0.6619718
0.5774648	0.5774648	0.5571429	0.5352113	0.5362319
0.5211268	0.5362319	0.5633803	0.5571429	0.6056338
0.5915493	0.6056338	0.6056338	0.6901408	0.5857143
0.5915493	0.5857143	0.5774648	0.5915493	0.6619718
0.6197183	0.6197183	0.6338028	1.0000000	
0.8450704	0.9014085	0.8873239	0.9014085	0.8873239
0.8169014	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.8028169	0.7605634	0.7323944	0.7183099
0.8591549	0.8028169	0.8873239	0.9000000	0.7464789
0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.7183099	0.9154930
0.9436620	0.9295775	0.9154930	0.8873239	0.8028169
0.8591549	0.9154930	0.8309859	0.8169014	0.8873239
0.9154930	0.9014085	0.9436620	0.8028169	0.8591549
0.8169014	0.7605634	0.7464789	0.8732394	0.9014085
0.8309859	0.8169014	0.8732394	0.8309859	0.7183099
0.7714286	0.7464789	0.8450704	0.7605634	0.8309859
0.8309859	0.8309859	0.7746479	0.7887324	0.8169014
0.7285714	0.6760563	0.8028169	0.7887324	0.7746479
0.8028169	0.8450704	0.6901408	0.6338028	0.6619718
0.6338028	0.5915493	0.6056338	0.6338028	0.7323944
0.6197183	0.6478873	0.5774648	0.7746479	0.6760563
0.6478873	0.6197183	0.7142857	0.6619718	0.6811594
0.6478873	0.6811594	0.6901408	0.7000000	0.7042254
0.6619718	0.6760563	0.6197183	0.7605634	0.7428571
0.8591549	0.8142857	0.6197183	0.6338028	0.6760563
0.5492958	0.5774648	0.7042254	0.5352113	1.0000000
0.8309859	0.8873239	0.9014085	0.8873239	0.9014085
0.8028169	0.7323944	0.7323944	0.7183099	0.7464789
0.7323944	0.8169014	0.7746479	0.7746479	0.7323944
0.8450704	0.7887324	0.8732394	0.8857143	0.7887324
0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.7323944	0.9295775
0.9014085	0.9436620	0.9014085	0.9014085	0.8169014

0.8732394	0.9014085	0.8169014	0.8028169	0.9014085
0.9014085	0.8873239	0.9295775	0.7887324	0.8450704
0.8591549	0.7746479	0.7323944	0.8591549	0.8591549
0.8450704	0.8873239	0.8591549	0.8450704	0.7042254
0.7285714	0.7323944	0.8309859	0.7464789	0.8450704
0.8450704	0.8450704	0.7887324	0.8309859	0.8309859
0.7428571	0.7183099	0.7887324	0.7746479	0.7605634
0.7887324	0.8028169	0.7042254	0.6197183	0.7042254
0.6478873	0.5774648	0.5915493	0.6197183	0.7464789
0.6338028	0.6338028	0.6197183	0.7605634	0.6619718
0.6056338	0.6056338	0.7000000	0.6760563	0.6956522
0.6619718	0.6956522	0.7042254	0.7142857	0.7183099
0.6760563	0.6901408	0.6338028	0.7746479	0.7285714
0.8450704	0.8000000	0.6056338	0.6760563	0.6901408
0.5633803	0.5915493	0.7464789	0.5774648	0.9014085
1.0000000				
0.8142857	0.8714286	0.8285714	0.8428571	0.8571429
0.7714286	0.6571429	0.6857143	0.6714286	0.7000000
0.7142857	0.8142857	0.7285714	0.7714286	0.7285714
0.8285714	0.7142857	0.8000000	0.8405797	0.7428571
0.7000000	0.6857143	0.7142857	0.7142857	0.8571429
0.8857143	0.8428571	0.8571429	0.8571429	0.8285714
0.8285714	0.8571429	0.7714286	0.8857143	0.8285714
0.8857143	0.8714286	0.8571429	0.8428571	0.8000000
0.7857143	0.7714286	0.7857143	0.9000000	0.8714286
0.8428571	0.8000000	0.8714286	0.8571429	0.7857143
0.8115942	0.8142857	0.8428571	0.8142857	0.7714286
0.7428571	0.7428571	0.7142857	0.7571429	0.7571429
0.6811594	0.6714286	0.7428571	0.7571429	0.7714286
0.7714286	0.7857143	0.6857143	0.6857143	0.7142857
0.5714286	0.5857143	0.5714286	0.6285714	0.7285714
0.6714286	0.6714286	0.6571429	0.7142857	0.6571429
0.6571429	0.6285714	0.7681159	0.7571429	0.7794118
0.7428571	0.7794118	0.7857143	0.7971014	0.7000000
0.6857143	0.7000000	0.7142857	0.7000000	0.7101449
0.8857143	0.7857143	0.6142857	0.6000000	0.6428571
0.5428571	0.5714286	0.7428571	0.5428571	0.8571429
0.8714286	1.0000000			
0.8857143	0.9428571	0.9285714	0.9428571	0.9285714
0.8000000	0.7857143	0.7857143	0.7428571	0.7714286
0.7857143	0.7571429	0.8000000	0.7428571	0.7285714
0.9000000	0.8428571	0.9285714	0.9420290	0.7857143
0.7142857	0.7000000	0.7285714	0.7571429	0.9000000
0.9571429	0.9428571	0.9285714	0.9285714	0.8714286
0.9000000	0.9285714	0.8142857	0.8285714	0.9000000
0.9285714	0.9142857	0.9000000	0.7571429	0.8714286
0.8000000	0.7428571	0.7857143	0.8285714	0.9142857
0.7857143	0.8000000	0.8857143	0.9000000	0.7000000
0.7246377	0.7285714	0.8000000	0.7142857	0.8428571
0.8428571	0.8428571	0.8000000	0.8428571	0.8285714

0.7826087	0.7428571	0.8142857	0.8000000	0.7857143
0.8142857	0.8285714	0.7285714	0.6571429	0.7000000
0.6857143	0.6428571	0.6571429	0.6714286	0.8142857
0.6285714	0.6285714	0.5857143	0.8000000	0.7571429
0.6285714	0.6285714	0.7681159	0.7142857	0.7205882
0.7000000	0.7205882	0.7428571	0.7391304	0.7428571
0.7142857	0.7142857	0.6857143	0.8142857	0.6956522
0.9000000	0.7971014	0.6714286	0.6714286	0.7142857
0.5714286	0.5857143	0.7714286	0.5714286	0.9000000
0.8857143	0.8405797	1.0000000		
0.7887324	0.8450704	0.8591549	0.8732394	0.8873239
0.7887324	0.7464789	0.7746479	0.7323944	0.7605634
0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.7183099
0.8028169	0.7464789	0.8591549	0.8428571	0.8028169
0.6760563	0.6901408	0.6901408	0.7464789	0.8873239
0.8873239	0.9295775	0.8591549	0.8873239	0.7746479
0.8591549	0.8873239	0.7746479	0.7605634	0.8591549
0.8873239	0.8450704	0.8873239	0.7464789	0.8028169
0.8169014	0.7323944	0.7183099	0.8169014	0.8169014
0.8028169	0.8169014	0.8450704	0.8591549	0.6619718
0.6857143	0.7183099	0.8169014	0.7042254	0.8309859
0.8309859	0.8309859	0.8028169	0.8450704	0.8169014
0.7285714	0.7605634	0.8028169	0.7887324	0.7746479
0.8028169	0.7887324	0.7464789	0.5774648	0.7183099
0.6619718	0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.7887324
0.6478873	0.6478873	0.6619718	0.7183099	0.6478873
0.5633803	0.5633803	0.6857143	0.6619718	0.6666667
0.6478873	0.6666667	0.6901408	0.6857143	0.7605634
0.7183099	0.7323944	0.6760563	0.7323944	0.7142857
0.8309859	0.7857143	0.6478873	0.6901408	0.7323944
0.6338028	0.6338028	0.7605634	0.6197183	0.8591549
0.9295775	0.8285714	0.8714286	1.0000000	
0.7887324	0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8591549
0.8169014	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.6760563	0.7887324	0.6901408
0.8309859	0.7464789	0.8028169	0.8428571	0.7746479
0.7323944	0.7464789	0.8028169	0.7746479	0.8309859
0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8591549	0.8591549
0.8028169	0.8591549	0.8309859	0.8169014	0.8309859
0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8028169	0.8591549
0.8169014	0.8169014	0.7464789	0.9014085	0.8450704
0.8028169	0.7887324	0.8450704	0.8309859	0.7464789
0.7714286	0.8028169	0.9014085	0.7887324	0.7746479
0.7464789	0.7464789	0.7746479	0.7887324	0.7323944
0.7571429	0.6760563	0.8309859	0.8169014	0.8028169
0.8309859	0.8450704	0.7183099	0.7464789	0.7183099
0.6619718	0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.7605634
0.7042254	0.7323944	0.6338028	0.7183099	0.6478873
0.6760563	0.6478873	0.8285714	0.7746479	0.7971014
0.7605634	0.7971014	0.8028169	0.8142857	0.7323944



0.7746479	0.7605634	0.7323944	0.7323944	0.6571429
0.8309859	0.7857143	0.6760563	0.6338028	0.7323944
0.6056338	0.6056338	0.7042254	0.6197183	0.8591549
0.8450704	0.8571429	0.8571429	0.8309859	1.0000000
0.7887324	0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8591549
0.7887324	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7887324	0.7183099
0.8591549	0.7464789	0.8028169	0.8428571	0.8309859
0.7323944	0.7183099	0.7746479	0.7183099	0.8309859
0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8591549	0.8873239
0.8028169	0.8591549	0.8309859	0.8169014	0.8309859
0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8028169	0.8309859
0.8169014	0.8169014	0.7464789	0.9014085	0.8450704
0.8028169	0.7887324	0.8169014	0.8028169	0.7464789
0.8000000	0.7746479	0.8732394	0.8169014	0.8028169
0.7746479	0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.7605634
0.7571429	0.6760563	0.8028169	0.7887324	0.7746479
0.8028169	0.8732394	0.6901408	0.7183099	0.7183099
0.6338028	0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.7323944
0.6760563	0.7042254	0.6338028	0.7183099	0.6478873
0.6760563	0.6478873	0.7714286	0.7183099	0.7391304
0.7042254	0.7391304	0.7464789	0.7571429	0.7042254
0.6901408	0.7042254	0.6760563	0.7323944	0.6857143
0.8309859	0.7857143	0.6478873	0.6338028	0.7042254
0.6338028	0.6338028	0.7042254	0.6197183	0.8591549
0.8450704	0.8571429	0.8714286	0.8309859	0.9154930
1.0000000				
0.7714286	0.8285714	0.7857143	0.8000000	0.8142857
0.7857143	0.6428571	0.6428571	0.6285714	0.6571429
0.6714286	0.7714286	0.6857143	0.7857143	0.7142857
0.7857143	0.6714286	0.7571429	0.7971014	0.7571429
0.7142857	0.7000000	0.7285714	0.7571429	0.8428571
0.8428571	0.8285714	0.8142857	0.8142857	0.8428571
0.7857143	0.8142857	0.8142857	0.8142857	0.7857143
0.8428571	0.8285714	0.8428571	0.8285714	0.7857143
0.8285714	0.7857143	0.7142857	0.9428571	0.8285714
0.8000000	0.7857143	0.8285714	0.8142857	0.7428571
0.7681159	0.7428571	0.8857143	0.8285714	0.7571429
0.7285714	0.7285714	0.7571429	0.7428571	0.7428571
0.7536232	0.6000000	0.7857143	0.8000000	0.8142857
0.8142857	0.8285714	0.7285714	0.7285714	0.7285714
0.6428571	0.6571429	0.6428571	0.6428571	0.7142857
0.7142857	0.7142857	0.6714286	0.6714286	0.6714286
0.6428571	0.6142857	0.8115942	0.7714286	0.7941176
0.7571429	0.7941176	0.8000000	0.8115942	0.7428571
0.7571429	0.7428571	0.7285714	0.6857143	0.6376812
0.8428571	0.7714286	0.6285714	0.6142857	0.6857143
0.5857143	0.5857143	0.7000000	0.5571429	0.8428571
0.8285714	0.8714286	0.8115942	0.7857143	0.9000000
0.8714286	1.0000000			

0.8732394	0.9295775	0.9436620	0.9295775	0.9436620
0.8169014	0.7464789	0.7464789	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.8028169	0.7887324	0.7605634	0.7183099
0.8873239	0.8309859	0.9154930	0.9428571	0.7746479
0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.7183099	0.9436620
0.9436620	0.9577465	0.9718310	0.9436620	0.8309859
0.9436620	0.9436620	0.8309859	0.8169014	0.9718310
0.9436620	0.9295775	0.9436620	0.7746479	0.8591549
0.8450704	0.7887324	0.7746479	0.8450704	0.9014085
0.8309859	0.8450704	0.9014085	0.8591549	0.7183099
0.7571429	0.7464789	0.8169014	0.7323944	0.8591549
0.8591549	0.8591549	0.8028169	0.8450704	0.8450704
0.7857143	0.7042254	0.8028169	0.7887324	0.7746479
0.8028169	0.8169014	0.6901408	0.6338028	0.6619718
0.6338028	0.5915493	0.6056338	0.6338028	0.7605634
0.6197183	0.6197183	0.5774648	0.7746479	0.7042254
0.6197183	0.6197183	0.7428571	0.6901408	0.7101449
0.6760563	0.7101449	0.7183099	0.7285714	0.7042254
0.6619718	0.6760563	0.6478873	0.8169014	0.7142857
0.9154930	0.8142857	0.6478873	0.6338028	0.6760563
0.5211268	0.5492958	0.7323944	0.5915493	0.9154930
0.9295775	0.8571429	0.9285714	0.8873239	0.8591549
0.8591549	0.8142857	1.0000000		
0.8285714	0.8857143	0.8714286	0.8857143	0.9000000
0.8142857	0.7000000	0.7285714	0.6857143	0.7142857
0.7285714	0.8285714	0.7428571	0.7857143	0.7142857
0.8714286	0.7571429	0.8428571	0.8840580	0.7857143
0.6857143	0.6714286	0.7285714	0.7285714	0.9000000
0.9285714	0.9142857	0.9000000	0.9000000	0.8428571
0.8428571	0.9000000	0.8428571	0.8714286	0.8714286
0.9285714	0.8857143	0.9285714	0.8571429	0.8428571
0.8285714	0.7857143	0.7714286	0.9142857	0.8857143
0.8857143	0.8714286	0.8571429	0.8428571	0.7714286
0.7971014	0.8000000	0.8857143	0.8000000	0.8428571
0.8142857	0.8142857	0.7857143	0.8000000	0.8000000
0.7536232	0.6857143	0.8142857	0.8000000	0.7857143
0.8142857	0.8571429	0.7000000	0.6714286	0.7000000
0.6142857	0.6000000	0.6142857	0.6428571	0.7428571
0.6857143	0.7142857	0.6428571	0.7285714	0.6428571
0.6428571	0.6142857	0.7536232	0.7142857	0.7352941
0.7000000	0.7352941	0.7428571	0.7536232	0.7142857
0.7000000	0.7142857	0.6714286	0.7428571	0.6956522
0.8714286	0.8000000	0.6000000	0.6142857	0.6857143
0.5571429	0.5857143	0.7285714	0.5571429	0.9285714
0.9142857	0.9000000	0.8840580	0.8714286	0.9000000
0.9000000	0.9142857	0.9000000	1.0000000	
0.7746479	0.8028169	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.8028169	0.6478873	0.6478873	0.6338028	0.6619718
0.6760563	0.7887324	0.6901408	0.8309859	0.7323944
0.7887324	0.6478873	0.7323944	0.7714286	0.7605634

0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.7887324	0.8169014
0.8169014	0.8028169	0.7887324	0.7887324	0.8450704
0.7605634	0.7887324	0.8169014	0.8309859	0.7605634
0.8169014	0.8309859	0.8169014	0.8450704	0.7605634
0.8309859	0.8309859	0.7605634	0.9154930	0.8028169
0.8169014	0.7746479	0.8028169	0.7887324	0.7887324
0.7857143	0.7605634	0.9154930	0.8591549	0.7605634
0.7323944	0.7323944	0.7323944	0.7183099	0.7746479
0.6857143	0.6056338	0.7887324	0.8028169	0.8169014
0.8169014	0.8028169	0.7605634	0.7605634	0.7323944
0.6478873	0.6619718	0.6478873	0.6478873	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.6478873	0.6760563	0.6338028
0.7183099	0.6901408	0.8142857	0.7887324	0.8115942
0.7746479	0.8115942	0.8169014	0.8285714	0.7746479
0.7605634	0.7464789	0.7746479	0.6619718	0.6571429
0.8169014	0.8000000	0.6338028	0.6478873	0.6901408
0.5915493	0.6197183	0.6901408	0.5492958	0.8169014
0.8028169	0.8714286	0.7714286	0.7605634	0.8450704
0.8450704	0.9142857	0.7887324	0.8571429	1.0000000
0.7323944	0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.7464789
0.7042254	0.6619718	0.6619718	0.6197183	0.6478873
0.6619718	0.6619718	0.6760563	0.7323944	0.7183099
0.7464789	0.7464789	0.7746479	0.7571429	0.7746479
0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.6901408	0.7464789
0.7464789	0.7605634	0.7464789	0.7464789	0.8309859
0.7183099	0.7464789	0.7183099	0.7042254	0.7464789
0.7464789	0.7605634	0.7464789	0.6619718	0.8028169
0.7605634	0.7605634	0.6901408	0.7323944	0.7323944
0.6901408	0.7323944	0.7042254	0.7183099	0.6056338
0.6857143	0.6338028	0.7323944	0.6760563	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.6619718	0.7042254	0.7042254
0.7285714	0.6197183	0.6901408	0.6760563	0.6619718
0.6901408	0.7042254	0.6619718	0.6619718	0.6901408
0.6338028	0.6197183	0.6338028	0.6619718	0.6478873
0.6197183	0.6197183	0.5774648	0.8873239	0.7605634
0.6760563	0.7042254	0.6714286	0.6338028	0.6376812
0.6197183	0.6376812	0.6338028	0.6428571	0.6760563
0.6338028	0.6478873	0.6197183	0.8732394	0.8142857
0.6901408	0.7571429	0.6197183	0.6056338	0.7323944
0.6338028	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.7746479
0.7605634	0.6857143	0.7857143	0.7183099	0.7464789
0.8028169	0.7000000	0.7746479	0.7285714	0.7323944
1.0000000				
0.6619718	0.7183099	0.7323944	0.7183099	0.7323944
0.6056338	0.6478873	0.6760563	0.6338028	0.6619718
0.6760563	0.6197183	0.6619718	0.6056338	0.6760563
0.6760563	0.7042254	0.7605634	0.7285714	0.7323944
0.6056338	0.6197183	0.6760563	0.6478873	0.7042254
0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.7323944	0.7323944
0.7323944	0.7605634	0.6197183	0.6619718	0.7323944

0.7605634	0.6901408	0.7323944	0.6197183	0.7605634
0.6619718	0.6619718	0.6760563	0.6901408	0.7183099
0.6478873	0.6619718	0.6619718	0.7042254	0.5633803
0.6000000	0.5633803	0.6619718	0.5774648	0.6478873
0.6478873	0.6478873	0.6478873	0.6901408	0.6338028
0.7428571	0.6338028	0.6478873	0.6338028	0.6197183
0.6478873	0.6619718	0.6478873	0.5915493	0.6478873
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.6478873	0.6901408
0.6056338	0.6338028	0.5633803	0.8732394	0.7746479
0.5774648	0.5774648	0.7142857	0.6197183	0.6086957
0.6056338	0.6086957	0.6197183	0.6142857	0.6338028
0.6197183	0.6338028	0.6056338	0.8873239	0.7857143
0.7042254	0.6857143	0.6619718	0.5915493	0.7183099
0.6197183	0.6197183	0.6338028	0.6338028	0.7605634
0.7183099	0.7000000	0.7857143	0.7042254	0.7323944
0.7323944	0.6857143	0.7605634	0.7142857	0.6619718
0.8732394	1.0000000			
0.7464789	0.7746479	0.8169014	0.7464789	0.7887324
0.7464789	0.7323944	0.7042254	0.6901408	0.6901408
0.7042254	0.6478873	0.6901408	0.7183099	0.8450704
0.7605634	0.7323944	0.8169014	0.8000000	0.9014085
0.6619718	0.6760563	0.6760563	0.6478873	0.7887324
0.7605634	0.8028169	0.7605634	0.7887324	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7887324	0.7183099	0.7887324
0.7887324	0.7464789	0.8169014	0.6760563	0.7323944
0.7464789	0.6619718	0.6760563	0.7746479	0.7464789
0.7042254	0.7183099	0.7464789	0.7605634	0.6197183
0.6142857	0.5915493	0.7464789	0.6901408	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.6901408	0.6901408
0.8857143	0.7183099	0.7887324	0.7464789	0.7323944
0.7605634	0.7746479	0.7042254	0.5633803	0.7042254
0.6760563	0.6901408	0.7042254	0.6760563	0.6901408
0.6338028	0.6338028	0.6478873	0.7042254	0.6619718
0.5211268	0.5211268	0.6428571	0.5915493	0.6086957
0.5774648	0.6086957	0.6197183	0.6285714	0.7183099
0.6760563	0.7183099	0.6338028	0.6901408	0.6714286
0.7323944	0.8571429	0.6901408	0.6760563	0.7183099
0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6056338	0.7887324
0.7746479	0.7000000	0.8000000	0.7887324	0.7605634
0.8169014	0.7428571	0.7887324	0.7714286	0.7183099
0.7605634	0.7183099	1.0000000		
0.7183099	0.7464789	0.7887324	0.7183099	0.7605634
0.7183099	0.7605634	0.7042254	0.7183099	0.7183099
0.7042254	0.6197183	0.6901408	0.6901408	0.8450704
0.7323944	0.7323944	0.7887324	0.7714286	0.9014085
0.6619718	0.6760563	0.6760563	0.6478873	0.7605634
0.7323944	0.7746479	0.7323944	0.7605634	0.7887324
0.7323944	0.7323944	0.7605634	0.6901408	0.7605634
0.7605634	0.7183099	0.7887324	0.6478873	0.7042254
0.7183099	0.6338028	0.6478873	0.7464789	0.7183099

0.6760563	0.7464789	0.7183099	0.7323944	0.5915493
0.5857143	0.5633803	0.7183099	0.6619718	0.7042254
0.6760563	0.6760563	0.7042254	0.6619718	0.6619718
0.8857143	0.7183099	0.7887324	0.7464789	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7042254	0.5352113	0.7042254
0.7042254	0.6901408	0.7042254	0.6760563	0.6901408
0.6056338	0.6056338	0.6197183	0.7042254	0.6619718
0.4929577	0.4929577	0.6285714	0.5915493	0.5942029
0.5774648	0.5942029	0.5915493	0.6000000	0.7183099
0.6760563	0.7183099	0.6338028	0.6901408	0.6714286
0.7042254	0.8285714	0.6901408	0.7042254	0.7183099
0.6760563	0.6760563	0.6619718	0.6056338	0.7605634
0.7746479	0.6714286	0.7714286	0.7605634	0.7323944
0.7887324	0.7142857	0.7605634	0.7428571	0.6901408
0.7605634	0.7183099	0.9718310	1.0000000	
0.6901408	0.7464789	0.7887324	0.7183099	0.7605634
0.7183099	0.7605634	0.7042254	0.7183099	0.7464789
0.7323944	0.6478873	0.6901408	0.7183099	0.8450704
0.7323944	0.7323944	0.7605634	0.7571429	0.9014085
0.6901408	0.7042254	0.7042254	0.6760563	0.7605634
0.7323944	0.7746479	0.7605634	0.7605634	0.8169014
0.7323944	0.7323944	0.7605634	0.7183099	0.7605634
0.7605634	0.7183099	0.7605634	0.6760563	0.7323944
0.7464789	0.6619718	0.7042254	0.7746479	0.7183099
0.7042254	0.7746479	0.6901408	0.7323944	0.6197183
0.6285714	0.5915493	0.7464789	0.6901408	0.7042254
0.6760563	0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.6619718
0.9142857	0.7183099	0.7887324	0.7464789	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.5633803	0.7323944
0.6760563	0.6619718	0.7042254	0.7042254	0.7183099
0.6338028	0.6338028	0.6478873	0.7323944	0.6619718
0.5211268	0.5211268	0.6857143	0.6197183	0.6231884
0.6056338	0.6231884	0.6197183	0.6285714	0.7464789
0.7042254	0.7464789	0.6619718	0.7464789	0.7000000
0.7323944	0.8285714	0.7183099	0.7042254	0.7464789
0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.6338028	0.7605634
0.8028169	0.7000000	0.7714286	0.7605634	0.7605634
0.7887324	0.7428571	0.7887324	0.7714286	0.7183099
0.7887324	0.7746479	0.9154930	0.9436620	1.0000000
0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7605634	0.7464789
0.6760563	0.8873239	0.8873239	0.9014085	0.9014085
0.8873239	0.6056338	0.7605634	0.5915493	0.6901408
0.7464789	0.6901408	0.7464789	0.7857143	0.7183099
0.7323944	0.7746479	0.7746479	0.7183099	0.7464789
0.7746479	0.7605634	0.7746479	0.7464789	0.7183099
0.7464789	0.7464789	0.6619718	0.6478873	0.7746479
0.7464789	0.7605634	0.7746479	0.6056338	0.6901408
0.6478873	0.5915493	0.7464789	0.6760563	0.7323944
0.6338028	0.7042254	0.7887324	0.7746479	0.6338028
0.5714286	0.6056338	0.7042254	0.5633803	0.7746479

0.7746479	0.7746479	0.7746479	0.8169014	0.7605634
0.7571429	0.8732394	0.7464789	0.7323944	0.7183099
0.7464789	0.6760563	0.7746479	0.5774648	0.7464789
0.8309859	0.7605634	0.7746479	0.7464789	0.8732394
0.6197183	0.6197183	0.6338028	0.6901408	0.5915493
0.5352113	0.5352113	0.7000000	0.6901408	0.6956522
0.6760563	0.6956522	0.6901408	0.7000000	0.7323944
0.7464789	0.7323944	0.7042254	0.7042254	0.6285714
0.7183099	0.6428571	0.7887324	0.8028169	0.7605634
0.6619718	0.6901408	0.8450704	0.5070423	0.7464789
0.7605634	0.6857143	0.8000000	0.7464789	0.7464789
0.7183099	0.6714286	0.7746479	0.7285714	0.6478873
0.6619718	0.6760563	0.7605634	0.7887324	0.7605634
1.0000000				
0.7323944	0.7887324	0.7746479	0.7887324	0.7746479
0.7042254	0.8873239	0.8591549	0.8732394	0.9014085
0.8873239	0.6338028	0.7887324	0.6478873	0.6901408
0.7746479	0.6901408	0.7464789	0.7857143	0.7183099
0.7323944	0.7746479	0.7746479	0.7183099	0.7746479
0.8028169	0.7887324	0.8028169	0.7746479	0.7183099
0.7464789	0.7746479	0.6901408	0.6760563	0.7746479
0.7746479	0.7887324	0.7746479	0.6338028	0.7183099
0.6760563	0.6197183	0.7746479	0.7042254	0.7605634
0.6619718	0.7042254	0.7887324	0.7746479	0.6619718
0.6000000	0.6338028	0.7323944	0.5915493	0.8309859
0.8309859	0.8309859	0.8028169	0.8450704	0.8169014
0.7285714	0.8450704	0.7464789	0.7323944	0.7183099
0.7464789	0.7323944	0.7746479	0.6056338	0.7464789
0.7746479	0.7323944	0.7464789	0.7464789	0.8169014
0.6478873	0.6478873	0.6619718	0.6619718	0.5633803
0.5633803	0.5633803	0.6857143	0.6619718	0.6811594
0.6478873	0.6811594	0.6901408	0.7000000	0.7605634
0.7464789	0.7323944	0.7042254	0.7042254	0.6000000
0.7464789	0.6714286	0.7605634	0.8028169	0.7605634
0.6338028	0.6901408	0.8732394	0.5633803	0.7746479
0.7887324	0.7142857	0.8142857	0.7746479	0.7464789
0.7464789	0.6714286	0.8028169	0.7571429	0.6760563
0.6619718	0.6197183	0.7323944	0.7323944	0.7323944
0.9154930	1.0000000			
0.8873239	0.9154930	0.9295775	0.9436620	0.9577465
0.8309859	0.7323944	0.7323944	0.6901408	0.7183099
0.7323944	0.8169014	0.7746479	0.7464789	0.7042254
0.9014085	0.8450704	0.9014085	0.9571429	0.7605634
0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.7042254	0.9577465
0.9295775	0.9436620	0.9577465	0.9577465	0.8169014
0.9295775	0.9295775	0.8450704	0.8028169	0.9859155
0.9295775	0.9436620	0.9295775	0.7605634	0.8450704
0.8591549	0.7746479	0.7605634	0.8309859	0.9154930
0.8169014	0.8309859	0.8873239	0.8450704	0.7323944
0.7714286	0.7605634	0.8028169	0.7464789	0.8450704

0.8450704	0.8450704	0.7887324	0.8309859	0.8309859
0.7714286	0.6901408	0.7887324	0.7746479	0.7605634
0.7887324	0.8028169	0.6760563	0.6197183	0.6478873
0.6197183	0.5774648	0.5915493	0.6197183	0.7464789
0.6056338	0.6056338	0.5633803	0.7605634	0.6901408
0.6056338	0.6056338	0.7285714	0.6760563	0.6956522
0.6619718	0.6956522	0.7042254	0.7142857	0.6901408
0.6478873	0.6619718	0.6338028	0.8028169	0.7000000
0.9014085	0.8000000	0.6338028	0.6197183	0.6619718
0.5070423	0.5352113	0.7183099	0.5774648	0.9014085
0.9154930	0.8428571	0.9142857	0.8732394	0.8450704
0.8450704	0.8000000	0.9859155	0.8857143	0.7746479
0.7605634	0.7464789	0.7746479	0.7464789	0.7746479
0.7605634	0.7887324	1.0000000		
0.5070423	0.5633803	0.5774648	0.5915493	0.5774648
0.5633803	0.7183099	0.7183099	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.4929577	0.6478873	0.5352113	0.5774648
0.5774648	0.4929577	0.5492958	0.5714286	0.6338028
0.6760563	0.7183099	0.7183099	0.6619718	0.5774648
0.6338028	0.5915493	0.6056338	0.5774648	0.6338028
0.6056338	0.6056338	0.5492958	0.5633803	0.5774648
0.6056338	0.5633803	0.5774648	0.4929577	0.5774648
0.5633803	0.5633803	0.6619718	0.6197183	0.5915493
0.4929577	0.5070423	0.5915493	0.6338028	0.5492958
0.5000000	0.4929577	0.6478873	0.5633803	0.6338028
0.6338028	0.6338028	0.6338028	0.6760563	0.6197183
0.6428571	0.7323944	0.6619718	0.6197183	0.6338028
0.6338028	0.6197183	0.7183099	0.5774648	0.7746479
0.7464789	0.7323944	0.7746479	0.8028169	0.7042254
0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.5492958	0.5633803
0.5633803	0.5915493	0.6714286	0.6056338	0.5942029
0.5915493	0.5942029	0.6056338	0.6000000	0.7042254
0.6619718	0.6760563	0.6760563	0.5915493	0.5714286
0.6056338	0.5285714	0.7323944	0.7183099	0.7605634
0.7464789	0.7746479	0.7042254	0.5352113	0.5774648
0.5633803	0.5714286	0.6142857	0.6056338	0.6338028
0.6619718	0.6428571	0.6056338	0.6142857	0.6197183
0.6338028	0.6478873	0.6197183	0.6197183	0.6760563
0.7183099	0.6901408	0.5915493	1.0000000	
0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.7042254	0.6901408
0.7323944	0.7464789	0.7464789	0.7605634	0.7887324
0.8028169	0.6338028	0.7323944	0.6760563	0.6619718
0.6619718	0.5774648	0.6619718	0.6714286	0.6901408
0.7887324	0.8309859	0.8309859	0.8591549	0.7183099
0.7183099	0.7323944	0.6901408	0.6901408	0.7464789
0.6901408	0.6901408	0.7183099	0.6760563	0.6619718
0.6901408	0.7323944	0.6901408	0.6619718	0.6901408
0.7323944	0.6478873	0.7183099	0.7605634	0.6760563
0.6338028	0.6760563	0.7323944	0.7746479	0.6901408
0.6000000	0.6056338	0.7887324	0.7042254	0.7464789

0.7464789	0.7464789	0.7183099	0.7323944	0.7887324
0.6714286	0.7605634	0.8028169	0.7887324	0.8028169
0.8028169	0.7042254	0.8873239	0.6901408	0.8873239
0.8309859	0.8169014	0.8309859	0.8309859	0.7605634
0.7887324	0.7605634	0.7746479	0.6338028	0.6760563
0.6478873	0.6760563	0.7857143	0.7746479	0.7681159
0.7605634	0.7681159	0.7746479	0.7714286	0.9014085
0.8591549	0.8450704	0.7887324	0.6760563	0.6428571
0.7183099	0.6714286	0.7323944	0.7746479	0.8450704
0.7464789	0.8028169	0.7605634	0.5915493	0.6901408
0.7042254	0.6857143	0.7000000	0.7183099	0.7183099
0.6901408	0.7285714	0.6901408	0.7000000	0.7887324
0.7183099	0.6478873	0.6478873	0.6478873	0.6760563
0.7183099	0.7464789	0.6760563	0.7464789	1.0000000
0.8309859	0.8309859	0.8169014	0.8591549	0.8732394
0.8873239	0.7605634	0.6760563	0.6901408	0.7183099
0.7042254	0.7605634	0.6901408	0.7746479	0.7042254
0.8450704	0.7323944	0.7887324	0.8571429	0.7605634
0.6901408	0.7042254	0.7323944	0.7323944	0.8732394
0.8450704	0.8591549	0.8450704	0.8732394	0.8450704
0.7887324	0.8169014	0.9014085	0.7746479	0.8450704
0.8450704	0.8873239	0.8450704	0.7887324	0.7887324
0.8591549	0.7464789	0.7042254	0.8591549	0.8309859
0.7887324	0.8309859	0.8309859	0.8169014	0.7323944
0.7571429	0.7605634	0.8873239	0.8028169	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7605634	0.7183099	0.7746479
0.7714286	0.6619718	0.8732394	0.8591549	0.8450704
0.8732394	0.8591549	0.7323944	0.6478873	0.7323944
0.7042254	0.6619718	0.6760563	0.6760563	0.7183099
0.6619718	0.6619718	0.6478873	0.6478873	0.6056338
0.6056338	0.6056338	0.7000000	0.6760563	0.6956522
0.6619718	0.6956522	0.7042254	0.7142857	0.7464789
0.7323944	0.7464789	0.6619718	0.6619718	0.6285714
0.8169014	0.8285714	0.6619718	0.7042254	0.7183099
0.5915493	0.6197183	0.6901408	0.5774648	0.8450704
0.8591549	0.7857143	0.8285714	0.8169014	0.8732394
0.8450704	0.8285714	0.8450704	0.8571429	0.8309859
0.7323944	0.6338028	0.8028169	0.8028169	0.8028169
0.7605634	0.7887324	0.8591549	0.5915493	0.7605634
1.0000000				
0.8591549	0.8873239	0.8732394	0.8591549	0.8732394
0.8309859	0.7323944	0.7042254	0.6901408	0.7183099
0.7323944	0.7887324	0.7183099	0.7746479	0.7605634
0.8169014	0.7887324	0.8450704	0.8571429	0.7887324
0.7183099	0.7042254	0.7605634	0.7323944	0.8732394
0.9014085	0.8873239	0.8732394	0.8732394	0.8732394
0.8450704	0.9014085	0.8450704	0.8028169	0.8732394
0.9014085	0.9154930	0.9014085	0.8169014	0.8169014
0.8591549	0.8309859	0.7887324	0.8873239	0.8591549
0.8169014	0.8028169	0.8591549	0.8169014	0.7605634



0.7857143	0.7605634	0.8591549	0.8028169	0.7887324
0.7887324	0.7887324	0.7605634	0.7746479	0.8309859
0.7714286	0.6619718	0.7887324	0.8028169	0.7887324
0.8169014	0.8309859	0.7042254	0.7042254	0.7042254
0.6478873	0.6338028	0.6197183	0.6478873	0.7464789
0.6338028	0.6338028	0.5915493	0.7323944	0.7183099
0.6901408	0.6619718	0.7571429	0.7042254	0.7246377
0.6901408	0.7246377	0.7323944	0.7428571	0.7183099
0.6760563	0.6901408	0.6619718	0.7464789	0.7142857
0.8450704	0.8285714	0.6338028	0.6478873	0.6901408
0.5352113	0.5633803	0.7183099	0.6056338	0.8732394
0.8591549	0.8428571	0.8857143	0.8169014	0.8732394
0.9014085	0.8571429	0.9014085	0.8571429	0.8591549
0.8169014	0.7464789	0.8028169	0.7746479	0.7746479
0.7323944	0.7605634	0.8873239	0.6197183	0.7323944
0.8591549	1.0000000			
0.7323944	0.7887324	0.7746479	0.7887324	0.7746479
0.7042254	0.9154930	0.8873239	0.9014085	0.9295775
0.9154930	0.6338028	0.7887324	0.6197183	0.6901408
0.7746479	0.6901408	0.7464789	0.7857143	0.7183099
0.7323944	0.8028169	0.8028169	0.7464789	0.7746479
0.8028169	0.7887324	0.8028169	0.7746479	0.7183099
0.7464789	0.7746479	0.6901408	0.6760563	0.7746479
0.7746479	0.7887324	0.7746479	0.6338028	0.7183099
0.6760563	0.6197183	0.7746479	0.7042254	0.7605634
0.6619718	0.7042254	0.7887324	0.7746479	0.6619718
0.6000000	0.6338028	0.7323944	0.5915493	0.8028169
0.8028169	0.8028169	0.7746479	0.8169014	0.7887324
0.7285714	0.8732394	0.7746479	0.7605634	0.7464789
0.7746479	0.7042254	0.8028169	0.5774648	0.7746479
0.8028169	0.7605634	0.7746479	0.7746479	0.8450704
0.6760563	0.6760563	0.6901408	0.6619718	0.5633803
0.5633803	0.5633803	0.6857143	0.6619718	0.6811594
0.6478873	0.6811594	0.6901408	0.7000000	0.7887324
0.7746479	0.7605634	0.7323944	0.7042254	0.6285714
0.7464789	0.6714286	0.7887324	0.8309859	0.7887324
0.6619718	0.7183099	0.9014085	0.5915493	0.7746479
0.7887324	0.7142857	0.8142857	0.7746479	0.7464789
0.7464789	0.6714286	0.8028169	0.7571429	0.6760563
0.6619718	0.6197183	0.7323944	0.7323944	0.7323944
0.9154930	0.9718310	0.7887324	0.6901408	0.7464789
0.7887324	0.7605634	1.0000000		
0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7605634	0.7746479
0.8169014	0.6901408	0.6619718	0.6478873	0.6760563
0.6901408	0.7746479	0.6478873	0.7887324	0.6901408
0.7464789	0.6619718	0.7183099	0.7571429	0.7746479
0.7323944	0.7464789	0.7464789	0.7183099	0.8028169
0.8028169	0.7887324	0.7746479	0.7746479	0.8591549
0.7464789	0.7746479	0.8028169	0.8169014	0.7464789
0.8028169	0.7887324	0.8028169	0.8028169	0.7464789

0.8169014	0.7605634	0.7746479	0.8732394	0.7887324
0.8028169	0.7605634	0.7887324	0.8028169	0.7183099
0.7428571	0.7464789	0.9014085	0.8169014	0.7183099
0.6901408	0.6901408	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7285714	0.6478873	0.8309859	0.8169014	0.8309859
0.8309859	0.8169014	0.7183099	0.6901408	0.7464789
0.6901408	0.6760563	0.6901408	0.7183099	0.7323944
0.6478873	0.6760563	0.6338028	0.6619718	0.6197183
0.6478873	0.6197183	0.7142857	0.7183099	0.7391304
0.7042254	0.7391304	0.7464789	0.7571429	0.7323944
0.7183099	0.7323944	0.6760563	0.6478873	0.6142857
0.7746479	0.7857143	0.6760563	0.6901408	0.7323944
0.6338028	0.6619718	0.6760563	0.5633803	0.8028169
0.7887324	0.8285714	0.7857143	0.7746479	0.8591549
0.8591549	0.8428571	0.7746479	0.8428571	0.8732394
0.7183099	0.6478873	0.7605634	0.7323944	0.7605634
0.6901408	0.7183099	0.7605634	0.6619718	0.7464789
0.8732394	0.8450704	0.7183099	1.0000000	
0.8169014	0.8732394	0.8591549	0.9014085	0.9154930
0.7887324	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7464789	0.7887324	0.7323944	0.6901408
0.8591549	0.7464789	0.8591549	0.8857143	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.7183099	0.8873239
0.9154930	0.9295775	0.9154930	0.9154930	0.8028169
0.8873239	0.8873239	0.8309859	0.7887324	0.8873239
0.9154930	0.8732394	0.8873239	0.7746479	0.8028169
0.7887324	0.7042254	0.7183099	0.8450704	0.8450704
0.8028169	0.8169014	0.8450704	0.8309859	0.6901408
0.7285714	0.7183099	0.8169014	0.7323944	0.8591549
0.8309859	0.8309859	0.8028169	0.7887324	0.8169014
0.7571429	0.6760563	0.8309859	0.8169014	0.8028169
0.8309859	0.8450704	0.6901408	0.6338028	0.6901408
0.6619718	0.6478873	0.6619718	0.6619718	0.7323944
0.6760563	0.6760563	0.6338028	0.6901408	0.6760563
0.5915493	0.5915493	0.7428571	0.6901408	0.6956522
0.6760563	0.6956522	0.7183099	0.7142857	0.7042254
0.6901408	0.7042254	0.6478873	0.7323944	0.6285714
0.9154930	0.8142857	0.6760563	0.6619718	0.6760563
0.5774648	0.6056338	0.7042254	0.5915493	0.8873239
0.8732394	0.8571429	0.9000000	0.8591549	0.8309859
0.8309859	0.8142857	0.9154930	0.9000000	0.7887324
0.6901408	0.7323944	0.7605634	0.7323944	0.7605634
0.7183099	0.7464789	0.9014085	0.6056338	0.6901408
0.8450704	0.8169014	0.7464789	0.8028169	1.0000000
0.7000000	0.7571429	0.7428571	0.7571429	0.7714286
0.6142857	0.8285714	0.8571429	0.8714286	0.9000000
0.9142857	0.6714286	0.7857143	0.6428571	0.7428571
0.7142857	0.7571429	0.7714286	0.7246377	0.7428571
0.8142857	0.8285714	0.8285714	0.7714286	0.7428571
0.7714286	0.7857143	0.7428571	0.7714286	0.7142857

0.7428571	0.7857143	0.6285714	0.6428571	0.7428571
0.7714286	0.7571429	0.7428571	0.6428571	0.7285714
0.6714286	0.6571429	0.7428571	0.7000000	0.7000000
0.6714286	0.7000000	0.7428571	0.7714286	0.6571429
0.6086957	0.6428571	0.6857143	0.6000000	0.8000000
0.8000000	0.8000000	0.7857143	0.8428571	0.8142857
0.7285714	0.8428571	0.7142857	0.7285714	0.7285714
0.7428571	0.6714286	0.8000000	0.6142857	0.7714286
0.7142857	0.7571429	0.7142857	0.7571429	0.8428571
0.6714286	0.6428571	0.6714286	0.7142857	0.6428571
0.6000000	0.6000000	0.7536232	0.7428571	0.7352941
0.7285714	0.7352941	0.7428571	0.7391304	0.7857143
0.8000000	0.7857143	0.7571429	0.7428571	0.6956522
0.7428571	0.6811594	0.7571429	0.7428571	0.7857143
0.6571429	0.7142857	0.8428571	0.6000000	0.7428571
0.7571429	0.7101449	0.7826087	0.7714286	0.7142857
0.7142857	0.6666667	0.7714286	0.7246377	0.6714286
0.7142857	0.7000000	0.7285714	0.7285714	0.7571429
0.8285714	0.8571429	0.7571429	0.6857143	0.7714286
0.6714286	0.7571429	0.8571429	0.6571429	0.7142857
1.0000000				
0.7605634	0.8450704	0.8028169	0.7887324	0.8028169
0.8169014	0.6619718	0.6901408	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.6760563	0.7887324	0.6901408
0.7746479	0.7183099	0.7464789	0.7857143	0.7464789
0.7605634	0.7464789	0.8028169	0.8028169	0.8028169
0.8309859	0.8169014	0.8028169	0.8028169	0.8309859
0.7464789	0.8028169	0.8309859	0.7887324	0.7746479
0.8309859	0.8169014	0.8309859	0.8309859	0.8028169
0.7887324	0.7887324	0.7183099	0.9014085	0.7887324
0.8028169	0.7887324	0.8169014	0.8028169	0.7464789
0.7714286	0.8028169	0.8732394	0.8169014	0.7746479
0.7464789	0.7464789	0.7464789	0.7323944	0.7605634
0.7000000	0.6478873	0.8028169	0.8169014	0.8028169
0.8309859	0.8169014	0.7464789	0.7464789	0.7464789
0.6619718	0.7042254	0.6619718	0.6901408	0.7042254
0.7042254	0.7042254	0.6338028	0.6338028	0.6197183
0.7042254	0.6760563	0.8000000	0.7746479	0.7681159
0.7605634	0.7681159	0.7746479	0.7857143	0.7323944
0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.6478873	0.6285714
0.8028169	0.7571429	0.6478873	0.6619718	0.7042254
0.5774648	0.6338028	0.7042254	0.6197183	0.8309859
0.8169014	0.8285714	0.7857143	0.8028169	0.9154930
0.8591549	0.8714286	0.8028169	0.8714286	0.8450704
0.6901408	0.6478873	0.7323944	0.7042254	0.7323944
0.6901408	0.7183099	0.7887324	0.6338028	0.7464789
0.8450704	0.8450704	0.7183099	0.8591549	0.8309859
0.7142857	1.0000000			
0.8169014	0.8732394	0.8591549	0.8732394	0.8591549
0.7605634	0.6901408	0.7183099	0.6760563	0.7042254

0.7183099	0.8028169	0.7042254	0.7323944	0.6338028
0.8309859	0.7746479	0.8309859	0.8714286	0.7183099
0.6760563	0.6619718	0.7183099	0.7183099	0.8591549
0.9154930	0.8732394	0.8873239	0.8591549	0.8028169
0.8309859	0.8873239	0.7746479	0.8169014	0.8591549
0.8873239	0.8732394	0.8873239	0.7746479	0.8873239
0.7887324	0.7887324	0.7464789	0.8450704	0.8732394
0.8028169	0.7887324	0.8450704	0.8309859	0.7183099
0.7428571	0.7746479	0.8169014	0.7323944	0.7746479
0.7746479	0.7746479	0.7183099	0.7887324	0.7605634
0.6714286	0.6760563	0.7464789	0.7323944	0.7183099
0.7464789	0.7887324	0.6619718	0.6901408	0.6901408
0.6338028	0.6197183	0.6056338	0.6619718	0.7323944
0.7042254	0.7323944	0.6338028	0.7746479	0.6760563
0.6760563	0.7042254	0.7428571	0.6901408	0.7101449
0.6760563	0.7101449	0.7183099	0.7285714	0.6760563
0.6619718	0.6760563	0.6478873	0.7887324	0.7428571
0.8309859	0.7285714	0.5633803	0.5774648	0.7323944
0.5774648	0.5774648	0.7042254	0.5915493	0.8873239
0.8732394	0.8571429	0.8714286	0.8309859	0.8873239
0.8591549	0.8142857	0.8873239	0.9000000	0.7887324
0.7746479	0.7605634	0.7042254	0.6760563	0.7042254
0.7183099	0.7464789	0.8732394	0.6619718	0.7183099
0.7887324				
	0.8450704	0.7464789	0.7746479	0.8309859
	0.8309859	1.0000000		0.7428571
	0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7746479
	0.7183099	0.8169014	0.8450704	0.8309859
	0.8732394	0.6478873	0.7746479	0.6619718
	0.7605634	0.6760563	0.7042254	0.7428571
	0.8309859	0.8732394	0.9014085	0.8450704
	0.7887324	0.7464789	0.7323944	0.7887324
	0.7042254	0.7605634	0.7323944	0.6901408
	0.7887324	0.7746479	0.7323944	0.7042254
	0.7183099	0.6619718	0.7605634	0.8028169
	0.6760563	0.6901408	0.7464789	0.7605634
	0.7000000	0.7042254	0.8028169	0.7183099
	0.7605634	0.7605634	0.7887324	0.8028169
	0.6857143	0.8028169	0.8169014	0.8309859
	0.8450704	0.7464789	0.8450704	0.6760563
	0.7605634	0.7746479	0.7605634	0.8169014
	0.7183099	0.7183099	0.7042254	0.6197183
	0.6338028	0.6056338	0.8285714	0.7887324
	0.7746479	0.7826087	0.7887324	0.7857143
	0.8450704	0.8309859	0.8309859	0.6338028
	0.7605634	0.6857143	0.7746479	0.7605634
	0.6760563	0.7323944	0.8309859	0.6056338
	0.7183099	0.7571429	0.7714286	0.7605634
	0.8169014	0.7714286	0.7323944	0.7714286
				0.7746479

0.6760563	0.6619718	0.6901408	0.6901408	0.7183099
0.7887324	0.7887324	0.7464789	0.7323944	0.7887324
0.7746479	0.8028169	0.8169014	0.7605634	0.7323944
0.8142857	0.8169014	0.7323944	1.0000000	
0.8591549	0.8873239	0.8450704	0.8591549	0.8450704
0.7464789	0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.6901408
0.7042254	0.7605634	0.7464789	0.6901408	0.6478873
0.8169014	0.7323944	0.8450704	0.9000000	0.6760563
0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.7042254	0.8732394
0.9014085	0.8591549	0.9014085	0.8450704	0.7887324
0.9014085	0.8732394	0.7605634	0.8028169	0.9014085
0.8732394	0.8873239	0.9014085	0.7605634	0.7887324
0.7746479	0.7183099	0.7605634	0.8591549	0.8873239
0.7605634	0.7464789	0.9154930	0.8732394	0.7042254
0.7428571	0.7323944	0.8028169	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.7605634	0.7042254	0.7464789	0.7746479
0.6857143	0.6619718	0.7323944		
0.7464789	0.7605634	0.7605634	0.7746479	0.6760563
0.6760563	0.6478873	0.6478873	0.6056338	0.5915493
0.6197183	0.7183099	0.6338028	0.6338028	0.5915493
0.6760563	0.6901408	0.6338028	0.6056338	0.7571429
0.6760563	0.6956522	0.6619718	0.6956522	0.7042254
0.7142857	0.6901408	0.6478873	0.6619718	0.6338028
0.7183099	0.6714286	0.9014085	0.7428571	0.6338028
0.6197183	0.6338028	0.5070423	0.5352113	0.7183099
0.5492958	0.8732394	0.8309859	0.9000000	0.8571429
0.7887324	0.8169014	0.8169014	0.8285714	0.9014085
0.8571429	0.8028169	0.6760563	0.7183099	0.7183099
0.6901408	0.6901408	0.7323944	0.7323944	0.8873239
0.6197183	0.6760563	0.7746479	0.8591549	0.7323944
0.7887324	0.9014085	0.7000000	0.8169014	0.8450704
0.7183099	1.0000000			
0.5774648	0.6338028	0.6197183	0.6619718	0.6478873
0.6338028	0.8450704	0.8169014	0.8028169	0.8309859
0.8450704	0.5352113	0.7464789	0.5774648	0.6760563
0.6197183	0.5633803	0.6197183	0.6285714	0.7042254
0.7183099	0.8169014	0.7887324	0.7605634	0.6760563
0.6760563	0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.6760563
0.6478873	0.6478873	0.6197183	0.5492958	0.6197183
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.5352113	0.6197183
0.6338028	0.5211268	0.6197183	0.6619718	0.6338028
0.5352113	0.5774648	0.6619718	0.6760563	0.5352113
0.4714286	0.4788732	0.6901408	0.5492958	0.7042254
0.7042254	0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6901408
0.7142857	0.8028169	0.7605634	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6619718	0.8450704	0.5633803	0.8450704
0.9014085	0.8873239	0.9014085	0.8732394	0.7746479
0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.5915493	0.6056338
0.5211268	0.5492958	0.6571429	0.6478873	0.6376812

0.6338028	0.6376812	0.6478873	0.6428571	0.8028169
0.7887324	0.8028169	0.7464789	0.6338028	0.5857143
0.6478873	0.6000000	0.8309859	0.8732394	0.8873239
0.7887324	0.8450704	0.8028169	0.5774648	0.6478873
0.6338028	0.5857143	0.6857143	0.6760563	0.6478873
0.6478873	0.6571429	0.6478873	0.6571429	0.6338028
0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.6901408	0.6901408
0.7887324	0.7887324	0.6338028	0.8450704	0.8169014
0.6901408	0.6619718	0.8169014	0.7042254	0.6760563
0.7571429	0.6760563	0.6478873	0.7746479	0.6338028
1.0000000				
0.5774648	0.6338028	0.6197183	0.6619718	0.6478873
0.6338028	0.8450704	0.8169014	0.8028169	0.8309859
0.8450704	0.5352113	0.7464789	0.5774648	0.6760563
0.6197183	0.5633803	0.6197183	0.6285714	0.7042254
0.7183099	0.8169014	0.7887324	0.7605634	0.6760563
0.6760563	0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.6760563
0.6478873	0.6478873	0.6197183	0.5492958	0.6197183
0.6478873	0.6338028	0.6478873	0.5352113	0.6197183
0.6338028	0.5211268	0.6197183	0.6619718	0.6338028
0.5352113	0.5774648	0.6619718	0.6760563	0.5352113
0.4714286	0.4788732	0.6901408	0.5492958	0.7042254
0.7042254	0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6901408
0.7142857	0.8028169	0.7605634	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6619718	0.8450704	0.5633803	0.8450704
0.9014085	0.8873239	0.9014085	0.8732394	0.7746479
0.7746479	0.7746479	0.7887324	0.5915493	0.6056338
0.5211268	0.5492958	0.6571429	0.6478873	0.6376812
0.6338028	0.6376812	0.6478873	0.6428571	0.8028169
0.7887324	0.8028169	0.7464789	0.6338028	0.5857143
0.6478873	0.6000000	0.8309859	0.8732394	0.8873239
0.7887324	0.8450704	0.8028169	0.5774648	0.6478873
0.6338028	0.5857143	0.6857143	0.6760563	0.6478873
0.6478873	0.6571429	0.6478873	0.6571429	0.6338028
0.6478873	0.6338028	0.6901408	0.6901408	0.6901408
0.7887324	0.7887324	0.6338028	0.8450704	0.8169014
0.6901408	0.6619718	0.8169014	0.7042254	0.6760563
0.7571429	0.6760563	0.6478873	0.7746479	0.6338028
1.0000000	1.0000000			
0.6760563	0.7323944	0.6901408	0.6760563	0.6619718
0.7042254	0.6901408	0.6901408	0.7042254	0.7323944
0.7464789	0.6901408	0.6760563	0.7323944	0.6619718
0.6901408	0.6056338	0.6619718	0.7000000	0.6619718
0.7605634	0.8028169	0.8309859	0.8309859	0.6901408
0.7183099	0.6760563	0.6901408	0.6619718	0.7183099
0.6619718	0.6901408	0.6338028	0.7323944	0.6619718
0.6901408	0.7042254	0.6901408	0.7183099	0.7183099
0.6760563	0.7323944	0.7746479	0.7605634	0.7323944
0.6901408	0.6478873	0.7323944	0.7746479	0.7464789
0.6857143	0.7183099	0.7605634	0.7042254	0.6901408

0.6901408	0.6901408	0.6619718	0.7042254	0.7042254
0.6428571	0.6760563	0.6901408		
0.7042254	0.7183099	0.7183099	0.6760563	0.8309859
0.7464789	0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.6619718
0.6901408	0.7042254	0.6760563	0.6760563	0.6338028
0.6056338	0.5915493	0.7605634	0.7323944	0.8285714
0.8028169	0.8550725	0.7887324	0.8550725	0.8591549
0.8714286	0.8169014	0.8309859	0.8169014	0.8450704
0.6197183	0.6000000	0.6901408	0.6571429	0.6760563
0.6901408	0.7323944	0.5774648	0.6338028	0.7605634
0.5633803	0.6901408	0.6760563	0.7571429	0.7000000
0.6619718	0.7746479	0.7183099	0.7428571	0.6901408
0.7142857	0.7887324	0.6338028	0.5915493	0.6197183
0.5915493	0.6197183	0.6901408	0.7464789	0.6760563
0.6338028	0.8028169	0.7042254	0.7323944	0.7464789
0.7464789	0.6338028	0.7428571	0.7746479	0.7183099
0.7605634	0.7042254	0.6760563	0.6760563	1.0000000
0.6901408	0.7464789	0.7042254	0.6901408	0.7042254
0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.7746479	0.6760563
0.7323944	0.6197183	0.6760563	0.7142857	0.6760563
0.8309859	0.8169014	0.8169014	0.8169014	0.7042254
0.7323944	0.6901408	0.7042254	0.7042254	0.7605634
0.6760563	0.7042254	0.6760563	0.7746479	0.6760563
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7323944	0.7323944
0.6901408	0.7464789	0.7887324	0.8028169	0.7464789
0.7042254	0.6619718	0.7183099	0.7605634	0.7605634
0.7000000	0.7042254	0.7746479	0.7183099	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.7183099
0.6857143	0.6338028	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.7183099	0.7887324	0.7887324	0.7323944
0.6760563	0.7183099	0.6760563	0.6760563	0.7464789
0.6619718	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6338028
0.7464789	0.7183099	0.9000000	0.9014085	0.9275362
0.8873239	0.9275362	0.9295775	0.9428571	0.7746479
0.8450704	0.8028169	0.8309859	0.6338028	0.6142857
0.7323944	0.7000000	0.6901408	0.6478873	0.6901408
0.5915493	0.6197183	0.7183099	0.5211268	0.7042254
0.6901408	0.8000000	0.7285714	0.6478873	0.8169014
0.7605634	0.8142857	0.7042254	0.7571429	0.8309859
0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.6338028	0.6619718
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6197183	0.7605634
0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7887324	0.6760563
0.7285714	0.7887324	0.7323944	0.7746479	0.7183099
0.6338028	0.6338028	0.9014085	1.0000000	
0.6901408	0.7464789	0.7042254	0.6901408	0.7042254
0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.6619718	0.6901408
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.7746479	0.6760563
0.7323944	0.6197183	0.6760563	0.7142857	0.6760563

0.8309859	0.8169014	0.8169014	0.8169014	0.7042254
0.7323944	0.6901408	0.7042254	0.7042254	0.7605634
0.6760563	0.7042254	0.6760563	0.7746479	0.6760563
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7323944	0.7323944
0.6901408	0.7464789	0.7887324	0.8028169	0.7464789
0.7042254	0.6619718	0.7183099	0.7605634	0.7605634
0.7000000	0.7042254	0.7746479	0.7183099	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.7183099
0.6857143	0.6338028	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.7183099	0.7887324	0.7887324	0.7323944
0.6760563	0.7183099	0.6760563	0.6760563	0.7464789
0.6619718	0.6619718	0.6197183	0.6478873	0.6338028
0.7464789	0.7183099	0.9000000	0.9014085	0.9275362
0.8873239	0.9275362	0.9295775	0.9428571	0.7746479
0.8450704	0.8028169	0.8309859	0.6338028	0.6142857
0.7323944	0.7000000	0.6901408	0.6478873	0.6901408
0.5915493	0.6197183	0.7183099	0.5211268	0.7042254
0.6901408	0.8000000	0.7285714	0.6478873	0.8169014
0.7605634	0.8142857	0.7042254	0.7571429	0.8309859
0.6478873	0.6338028	0.6619718	0.6338028	0.6619718
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6197183	0.7605634
0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7887324	0.6760563
0.7285714	0.7887324	0.7323944	0.7746479	0.7183099
0.6338028	0.6338028	0.9014085	1.0000000	1.0000000
0.6338028	0.6901408	0.6478873	0.6901408	0.7042254
0.6338028	0.7042254	0.7323944	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.6197183	0.6901408	0.6619718	0.5915493
0.6760563	0.5633803	0.6478873	0.6571429	0.6197183
0.8028169	0.8732394	0.8732394	0.8450704	0.6760563
0.7323944	0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.7042254
0.6760563	0.7042254	0.6478873	0.6619718	0.6478873
0.7323944	0.6901408	0.6760563	0.6478873	0.6760563
0.6619718	0.6619718	0.7042254	0.7746479	0.6901408
0.6197183	0.6056338	0.7183099	0.7323944	0.6760563
0.6142857	0.6478873	0.7746479	0.6619718	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.7183099
0.6000000	0.6901408	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.6901408	0.8169014	0.7323944	0.7605634
0.7323944	0.7746479	0.7323944	0.7323944	0.7746479
0.7464789	0.7464789	0.6760563	0.5915493	0.6056338
0.6338028	0.6056338	0.8714286	0.8450704	0.8550725
0.8309859	0.8550725	0.8732394	0.8714286	0.8028169
0.8732394	0.8309859	0.8309859	0.6338028	0.5857143
0.7605634	0.6000000	0.7464789	0.7042254	0.7464789
0.6478873	0.6760563	0.7746479	0.6056338	0.6760563
0.6619718	0.7285714	0.7000000	0.6760563	0.8169014
0.7323944	0.7714286	0.6760563	0.7142857	0.7746479
0.6197183	0.6338028	0.5774648	0.5492958	0.5774648
0.6760563	0.7042254	0.6619718	0.6197183	0.7887324
0.6901408	0.7183099	0.7323944	0.7323944	0.6760563



0.7285714	0.7887324	0.7042254	0.8309859	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.8169014	0.8591549	0.8591549
1.0000000				
0.6857143	0.7428571	0.7000000	0.7142857	0.7285714
0.6571429	0.7571429	0.7571429	0.7714286	0.8000000
0.8142857	0.6285714	0.7285714	0.7000000	0.6428571
0.7285714	0.6142857	0.7000000	0.7101449	0.6714286
0.8142857	0.8857143	0.9285714	0.8857143	0.6857143
0.7571429	0.7142857	0.7000000	0.7285714	0.7428571
0.6857143	0.7285714	0.6714286	0.7000000	0.6714286
0.7571429	0.7142857	0.7000000	0.6714286	0.7285714
0.6714286	0.6857143	0.7285714	0.7857143	0.7285714
0.6428571	0.6285714	0.7285714	0.8000000	0.7000000
0.6376812	0.6714286	0.7857143	0.6714286	0.7571429
0.7285714	0.7285714	0.7571429	0.7714286	0.7428571
0.6811594	0.7428571	0.7857143	0.8000000	0.8000000
0.8142857	0.7428571	0.8857143	0.7714286	0.8000000
0.7714286	0.8142857	0.7714286	0.7714286	0.8000000
0.7571429	0.7571429	0.7142857	0.6142857	0.6142857
0.6857143	0.6571429	0.9130435	0.8285714	0.8382353
0.8142857	0.8382353	0.8571429	0.8550725	0.8714286
0.9428571	0.9000000	0.8714286	0.6571429	0.6376812
0.7428571	0.6521739	0.7857143	0.7428571	0.7857143
0.6857143	0.7142857	0.7857143	0.6000000	0.7000000
0.6857143	0.7391304	0.7536232	0.7000000	0.8428571
0.7571429	0.7826087	0.7000000	0.7391304	0.7857143
0.6428571	0.6571429	0.6571429	0.6285714	0.6571429
0.7285714	0.7571429	0.6857143	0.6571429	0.8285714
0.7428571	0.7428571	0.7857143	0.7428571	0.7000000
0.7826087	0.8142857	0.7285714	0.8571429	0.7000000
0.7285714	0.7285714	0.8857143	0.9000000	0.9000000
0.9285714	1.0000000			
0.8028169	0.8028169	0.7887324	0.8309859	0.8169014
0.7746479	0.7323944	0.7887324	0.7464789	0.7464789
0.7605634	0.7605634	0.7464789	0.6901408	0.6478873
0.8169014	0.7323944	0.7887324	0.8714286	0.7042254
0.6338028	0.6760563	0.7323944	0.7605634	0.8450704
0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8169014	0.7605634
0.8169014	0.8169014	0.7605634	0.7464789	0.8732394
0.8169014	0.8309859	0.8732394	0.7605634	0.7605634
0.7746479	0.6901408	0.7605634	0.8028169	0.8309859
0.7887324	0.8028169	0.8309859	0.8169014	0.7323944
0.7142857	0.7323944	0.8309859	0.7183099	0.7605634
0.7605634	0.7605634	0.7042254	0.7464789	0.7464789
0.6857143	0.7464789	0.8169014	0.8028169	0.7887324
0.8169014	0.7464789	0.7323944	0.5915493	0.7042254
0.6760563	0.6056338	0.6197183	0.6478873	0.7746479
0.6338028	0.6619718	0.5915493	0.6760563	0.5774648
0.5774648	0.5492958	0.7142857	0.6478873	0.6521739
0.6338028	0.6521739	0.6478873	0.6571429	0.7464789

0.7042254	0.6901408	0.6619718	0.7183099	0.6714286
0.7887324	0.6857143	0.6338028	0.6478873	0.6901408
0.5633803	0.5915493	0.7183099	0.5492958	0.8450704
0.8309859	0.7857143	0.8000000	0.8169014	0.8169014
0.7887324	0.7714286	0.8450704	0.8571429	0.7746479
0.6760563	0.6901408	0.6901408	0.6901408	0.7183099
0.7605634	0.7323944	0.8591549	0.6197183	0.7042254
0.8028169	0.7746479	0.7605634	0.7605634	0.8169014
0.7000000	0.7887324	0.8169014	0.8028169	0.8309859
0.6619718	0.6619718	0.7042254	0.6619718	0.6619718
0.6901408	0.7142857	1.0000000		
0.8028169	0.8591549	0.8732394	0.8028169	0.8169014
0.7746479	0.6197183	0.6478873	0.6056338	0.6338028
0.6478873	0.8450704	0.7183099	0.8028169	0.6478873
0.7887324	0.7605634	0.8169014	0.8428571	0.7605634
0.6338028	0.5915493	0.6197183	0.6760563	0.8450704
0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8169014	0.8450704
0.8450704	0.8450704	0.7605634	0.8873239	0.8450704
0.8450704	0.8309859	0.8450704	0.8169014	0.7887324
0.8028169	0.8028169	0.7887324	0.8028169	0.8591549
0.8732394	0.8309859	0.8028169	0.8169014	0.7605634
0.7714286	0.7605634	0.8028169	0.7746479	0.7323944
0.7323944	0.7323944	0.6760563	0.7464789	0.7464789
0.6857143	0.6056338	0.6760563	0.6619718	0.6760563
0.6760563	0.7183099	0.6478873	0.6760563	0.5915493
0.5352113	0.5211268	0.5070423	0.5633803	0.6619718
0.5492958	0.5774648	0.5070423	0.7323944	0.6338028
0.6619718	0.6338028	0.7285714	0.6760563	0.6666667
0.6619718	0.6666667	0.6760563	0.6857143	0.6619718
0.6197183	0.6338028	0.6338028	0.7464789	0.6857143
0.8169014	0.7714286	0.5492958	0.5352113	0.6056338
0.4788732	0.4788732	0.6619718	0.5492958	0.8169014
0.8309859	0.8428571	0.8285714	0.8169014	0.7887324
0.8169014	0.7714286	0.8732394	0.8285714	0.8028169
0.7323944	0.7183099	0.7183099	0.6901408	0.7183099
0.6478873	0.6760563	0.8591549	0.5633803	0.6478873
0.7464789	0.8309859	0.6760563	0.7887324	0.7887324
0.6714286	0.7605634	0.8169014	0.6619718	0.8309859
0.5492958	0.5492958	0.7323944	0.7183099	0.7183099
0.6338028	0.6714286	0.8028169	1.0000000	
0.6619718	0.7183099	0.6760563	0.6901408	0.6760563
0.6338028	0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.5915493	0.7464789	0.6619718	0.6197183
0.6760563	0.5915493	0.6760563	0.7000000	0.6478873
0.7746479	0.8732394	0.8450704	0.8732394	0.6760563
0.7042254	0.6901408	0.7042254	0.6760563	0.7042254
0.7042254	0.6760563	0.6197183	0.6338028	0.6760563
0.6760563	0.6901408	0.6478873	0.5915493	0.7042254
0.6619718	0.6338028	0.7323944	0.7183099	0.6901408
0.5633803	0.5774648	0.7183099	0.7605634	0.6197183

0.5714286	0.5915493	0.7183099	0.6056338	0.7042254
0.7042254	0.7042254	0.7042254	0.7464789	0.7183099
0.6571429	0.7183099	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.7605634	0.6338028	0.8732394	0.7042254	0.7323944
0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.7323944	0.8028169
0.7746479	0.7464789	0.7042254	0.5915493	0.6056338
0.6338028	0.6338028	0.8714286	0.8169014	0.8260870
0.8028169	0.8260870	0.8450704	0.8428571	0.8309859
0.8732394	0.8591549	0.8591549	0.6619718	0.5857143
0.7323944	0.6285714	0.7746479	0.7323944	0.7746479
0.6478873	0.6760563	0.8028169	0.5774648	0.6478873
0.6619718	0.7000000	0.7285714	0.6760563	0.7605634
0.6760563	0.7142857	0.7042254	0.6571429	0.7183099
0.6197183	0.6901408	0.6056338	0.5774648	0.6338028
0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.6478873	0.7887324
0.6619718	0.6901408	0.7323944	0.6760563	0.7042254
0.7285714	0.7323944	0.6760563	0.7746479	0.7183099
0.7183099	0.7183099	0.8169014	0.8309859	0.8309859
0.8873239	0.9000000	0.6901408	0.6619718	1.0000000
0.6901408	0.7464789	0.7042254	0.7183099	0.7042254
0.6619718	0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.6197183	0.7746479	0.6901408	0.6197183
0.7042254	0.6197183	0.7042254	0.7142857	0.6478873
0.8028169	0.8732394	0.8450704	0.9014085	0.7042254
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7042254	0.7323944
0.7042254	0.7042254	0.6478873	0.6619718	0.6760563
0.7042254	0.7183099	0.6760563	0.6197183	0.7323944
0.6901408	0.6619718	0.7323944	0.7464789	0.7183099
0.5915493	0.6056338	0.7464789	0.7887324	0.6478873
0.5857143	0.6197183	0.7464789	0.6338028	0.7323944
0.7323944	0.7323944	0.7323944	0.7746479	0.7464789
0.6285714	0.7183099	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.6619718	0.8732394	0.7323944	0.7605634
0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.7323944	0.8028169
0.7746479	0.7464789	0.7042254	0.6197183	0.6338028
0.6619718	0.6619718	0.8714286	0.8450704	0.8550725
0.8309859	0.8550725	0.8732394	0.8714286	0.8591549
0.9014085	0.8591549	0.8591549	0.6619718	0.5857143
0.7323944	0.6571429	0.7464789	0.7323944	0.7746479
0.6478873	0.6760563	0.8028169	0.5774648	0.6760563
0.6901408	0.7285714	0.7571429	0.7042254	0.7887324
0.7042254	0.7428571	0.7042254	0.6857143	0.7464789
0.6478873	0.6619718	0.6056338	0.5774648	0.6056338
0.7042254	0.7323944	0.6901408	0.6197183	0.8169014
0.6901408	0.7183099	0.7605634	0.7042254	0.7042254
0.7571429	0.7605634	0.7042254	0.8028169	0.7183099
0.7183099	0.7183099	0.8450704	0.8591549	0.8591549
0.9154930	0.9285714	0.6901408	0.6619718	0.9718310
1.0000000				

0.8450704	0.8732394	0.8591549	0.8732394	0.8873239
0.7605634	0.6901408	0.7183099	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.7746479	0.7887324	0.7323944	0.6901408
0.8028169	0.7464789	0.8873239	0.8857143	0.7183099
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.7464789	0.9154930
0.8873239	0.9295775	0.8873239	0.8873239	0.7746479
0.9436620	0.8873239	0.7746479	0.7605634	0.9154930
0.8873239	0.8732394	0.9154930	0.7746479	0.7746479
0.8169014	0.7042254	0.7183099	0.8450704	0.8450704
0.8028169	0.8169014	0.9014085	0.8873239	0.6901408
0.7000000	0.6901408	0.7887324	0.7323944	0.8309859
0.8309859	0.8309859	0.7746479	0.7887324	0.8450704
0.7285714	0.6760563	0.7746479	0.7887324	0.8028169
0.8028169	0.7887324	0.7183099	0.6056338	0.6901408
0.6619718	0.6197183	0.6056338	0.6056338	0.7323944
0.6478873	0.6197183	0.6056338	0.6901408	0.7042254
0.5633803	0.5633803	0.7428571	0.6901408	0.6956522
0.6760563	0.6956522	0.7183099	0.7142857	0.7323944
0.6901408	0.7042254	0.6478873	0.7323944	0.6571429
0.9154930	0.7571429	0.6197183	0.6338028	0.6760563
0.5211268	0.5492958	0.7323944	0.5915493	0.8591549
0.8732394	0.8285714	0.8714286	0.8591549	0.7746479
0.7746479	0.8142857	0.9154930	0.8428571	0.7887324
0.6901408	0.7042254	0.7605634	0.7323944	0.7323944
0.7183099	0.7183099	0.9014085	0.5774648	0.7183099
0.7887324	0.8450704	0.7183099	0.7464789	0.8873239
0.7428571	0.7746479	0.8028169	0.7042254	0.9014085
0.6478873	0.6478873	0.6901408	0.6760563	0.6760563
0.6760563	0.6857143	0.8450704	0.8450704	0.7042254
0.7042254	1.0000000			
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.7183099
0.7323944	0.6760563	0.7464789	0.7746479	0.6760563
0.7605634	0.6478873	0.7323944	0.7571429	0.7042254
0.8591549	0.8450704	0.8169014	0.8732394	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7605634	0.7605634	0.7887324
0.7605634	0.7323944	0.7042254	0.7464789	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7042254	0.7042254	0.7605634
0.7183099	0.7183099	0.7887324	0.8028169	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.7464789	0.7887324	0.7323944
0.6857143	0.6760563	0.7746479	0.7183099	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7605634	0.7746479	0.7746479
0.6571429	0.6619718	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.7183099	0.8169014	0.7605634	0.7605634
0.6760563	0.7183099	0.6760563	0.7042254	0.7464789
0.7183099	0.6901408	0.6478873	0.6478873	0.6338028
0.7183099	0.7183099	0.9285714	0.9014085	0.9130435
0.8873239	0.9130435	0.9295775	0.9285714	0.8028169
0.8450704	0.8309859	0.8591549	0.6619718	0.5857143
0.8169014	0.7142857	0.7183099	0.6760563	0.7183099

0.5915493	0.6478873	0.7464789	0.5774648	0.7042254
0.7183099	0.7857143	0.7714286	0.7042254	0.7887324
0.7605634	0.7714286	0.7605634	0.7428571	0.8309859
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.6338028	0.6901408
0.6760563	0.7042254	0.7464789	0.6478873	0.7887324
0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7605634	0.7605634
0.7571429	0.7887324	0.7323944	0.8028169	0.7464789
0.6619718	0.6619718	0.8450704	0.9154930	0.9154930
0.8591549	0.8714286	0.6901408	0.7464789	0.8873239
0.8873239	0.7605634	1.0000000		
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.7464789	0.7605634
0.6901408	0.6760563	0.7042254	0.6901408	0.7183099
0.7323944	0.6760563	0.7464789	0.7746479	0.6760563
0.7605634	0.6478873	0.7323944	0.7428571	0.7042254
0.8591549	0.8450704	0.8169014	0.8732394	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7323944	0.7605634	0.7887324
0.7323944	0.7323944	0.7042254	0.7464789	0.7042254
0.7605634	0.7464789	0.7042254	0.7042254	0.7605634
0.7183099	0.7183099	0.7605634	0.8028169	0.7464789
0.6760563	0.6619718	0.7464789	0.7887324	0.7323944
0.6714286	0.6760563	0.7746479	0.7183099	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7887324	0.8028169	0.7746479
0.6571429	0.6619718	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.7183099	0.8169014	0.7887324	0.7605634
0.7042254	0.7464789	0.7042254	0.7042254	0.7746479
0.7183099	0.6901408	0.6478873	0.6760563	0.6619718
0.7183099	0.7183099	0.9285714	0.9295775	0.9420290
0.9154930	0.9420290	0.9577465	0.9571429	0.8028169
0.8732394	0.8309859	0.8591549	0.6619718	0.5857143
0.7887324	0.7142857	0.7183099	0.6760563	0.7183099
0.6197183	0.6478873	0.7464789	0.5492958	0.7042254
0.7183099	0.7857143	0.7857143	0.7042254	0.8169014
0.7605634	0.8000000	0.7323944	0.7428571	0.8309859
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.6338028	0.6619718
0.7042254	0.7042254	0.7183099	0.6197183	0.7887324
0.7183099	0.7464789	0.7042254	0.7605634	0.7323944
0.7571429	0.7887324	0.7323944	0.8028169	0.7183099
0.6619718	0.6619718	0.8450704	0.9436620	0.9436620
0.8873239	0.9000000	0.6619718	0.7183099	0.8873239
0.9154930	0.7323944	0.9718310	1.0000000	
0.7042254	0.7605634	0.7183099	0.7323944	0.7464789
0.6760563	0.7464789	0.7746479	0.7605634	0.7887324
0.8028169	0.6056338	0.7605634	0.7042254	0.6619718
0.7464789	0.6056338	0.7183099	0.7428571	0.7183099
0.7887324	0.8591549	0.8591549	0.8873239	0.7183099
0.7464789	0.7323944	0.7464789	0.7464789	0.7746479
0.7464789	0.7183099	0.6901408	0.7042254	0.7183099
0.7464789	0.7323944	0.6901408	0.6619718	0.7183099
0.7042254	0.6478873	0.7464789	0.7887324	0.7323944
0.6338028	0.6478873	0.7605634	0.8028169	0.6901408

0.6428571	0.6338028	0.7887324	0.6760563	0.7746479
0.7464789	0.7464789	0.7464789	0.7605634	0.7605634
0.6714286	0.7323944	0.7746479	0.7887324	0.8028169
0.8028169	0.7042254	0.8873239	0.7183099	0.8028169
0.7464789	0.7887324	0.7464789	0.7746479	0.7605634
0.7605634	0.7323944	0.7183099	0.6056338	0.6197183
0.6478873	0.6478873	0.8857143	0.8028169	0.8115942
0.7887324	0.8115942	0.8309859	0.8285714	0.8732394
0.8873239	0.8732394	0.8732394	0.6760563	0.6000000
0.8028169	0.6714286	0.7887324	0.7464789	0.7605634
0.6901408	0.7183099	0.8169014	0.6478873	0.6901408
0.7042254	0.7428571	0.7571429	0.7464789	0.7746479
0.7746479	0.7571429	0.7464789	0.7285714	0.7887324
0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.6478873	0.6760563
0.6901408	0.7464789	0.7323944	0.6619718	0.8309859
0.7323944	0.7323944	0.7746479	0.7183099	0.7464789
0.7428571	0.7746479	0.6901408	0.8450704	0.7323944
0.7323944	0.7323944	0.8309859	0.8169014	0.8169014
0.8732394	0.9142857	0.7323944	0.7323944	0.9014085
0.9014085	0.7464789	0.9014085	0.8732394	1.0000000
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.7464789	0.7323944
0.6901408	0.7323944	0.7605634	0.7464789	0.7746479
0.7887324	0.6478873	0.7746479	0.7183099	0.6197183
0.7323944	0.6478873	0.7323944	0.7571429	0.6760563
0.8028169	0.8450704	0.8450704	0.9295775	0.7323944
0.7605634	0.7464789	0.7605634	0.7323944	0.7605634
0.7605634	0.7323944	0.6760563	0.6901408	0.7323944
0.7323944	0.7464789	0.7042254	0.6478873	0.7605634
0.7183099	0.6901408	0.7605634	0.7746479	0.7464789
0.6197183	0.6338028	0.7746479	0.8169014	0.6760563
0.6285714	0.6478873	0.7746479	0.6619718	0.7605634
0.7605634	0.7605634	0.7323944	0.7746479	0.7746479
0.6285714	0.7183099	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.6901408	0.8732394	0.7323944	0.7887324
0.7323944	0.7746479	0.7042254	0.7323944	0.7746479
0.7464789	0.7183099	0.6760563	0.6197183	0.6338028
0.6901408	0.6901408	0.9000000	0.8169014	0.8260870
0.8028169	0.8260870	0.8450704	0.8428571	0.8591549
0.8732394	0.8591549	0.8591549	0.6619718	0.6142857
0.7887324	0.6571429	0.7464789	0.7323944	0.7746479
0.6478873	0.6760563	0.8028169	0.6338028	0.7042254
0.7183099	0.7285714	0.7714286	0.7605634	0.7887324
0.7605634	0.7428571	0.7605634	0.7142857	0.7746479
0.6760563	0.6619718	0.6619718	0.6338028	0.6619718
0.7042254	0.7323944	0.7464789	0.6760563	0.8169014
0.7183099	0.7464789	0.7605634	0.7042254	0.7323944
0.7571429	0.7887324	0.7323944	0.8309859	0.7464789
0.7183099	0.7183099	0.8450704	0.8309859	0.8309859
0.8591549	0.9000000	0.7464789	0.7464789	0.9154930

0.9154930	0.7605634	0.9154930	0.8873239	0.9577465
1.0000000				
0.7464789	0.8028169	0.7605634	0.7746479	0.7605634
0.6901408	0.7042254	0.7323944	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.6478873	0.7746479	0.7183099	0.6478873
0.7605634	0.6478873	0.7605634	0.7857143	0.6760563
0.8309859	0.8169014	0.7887324	0.8732394	0.7605634
0.7887324	0.7746479	0.7887324	0.7605634	0.7887324
0.7887324	0.7605634	0.7042254	0.7183099	0.7605634
0.7605634	0.7746479	0.7323944	0.6760563	0.7605634
0.7464789	0.6901408	0.7887324	0.8028169	0.7746479
0.6478873	0.6619718	0.7746479	0.8169014	0.7042254
0.6571429	0.6197183	0.7746479	0.6901408	0.7887324
0.7887324	0.7887324	0.7887324	0.8309859	0.8028169
0.6857143	0.6901408	0.7605634	0.7746479	0.7887324
0.7887324	0.7183099	0.8450704	0.7605634	0.7605634
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7042254	0.8028169
0.6901408	0.6619718	0.6478873	0.6760563	0.6901408
0.6901408	0.6901408	0.9285714	0.8732394	0.8840580
0.8591549	0.8840580	0.9014085	0.9000000	0.8309859
0.8450704	0.8028169	0.8028169	0.7183099	0.6142857
0.8169014	0.6857143	0.7464789	0.7042254	0.7183099
0.6197183	0.6478873	0.7746479	0.5492958	0.7323944
0.7464789	0.7571429	0.8142857	0.7323944	0.7887324
0.7605634	0.8000000	0.7887324	0.7428571	0.8028169
0.7042254	0.7183099	0.6619718	0.6338028	0.6901408
0.7323944	0.7323944	0.7746479	0.6760563	0.8169014
0.7183099	0.7746479	0.7323944	0.7323944	0.7605634
0.7571429	0.7605634	0.7323944	0.8028169	0.7746479
0.6901408	0.6901408	0.8169014	0.8873239	0.8873239
0.8591549	0.8714286	0.7183099	0.7464789	0.9154930
0.9154930	0.7887324	0.9436620	0.9436620	0.9014085
0.9154930	1.0000000			
0.6619718	0.7183099	0.6760563	0.7183099	0.7323944
0.7183099	0.7042254	0.7323944	0.7183099	0.7464789
0.7605634	0.6760563	0.7464789	0.7464789	0.6478873
0.7042254	0.5915493	0.6760563	0.7000000	0.6760563
0.8028169	0.8450704	0.8450704	0.9014085	0.7323944
0.7323944	0.7464789	0.7323944	0.7323944	0.7323944
0.7323944	0.7042254	0.7042254	0.6901408	0.7042254
0.7323944	0.7183099	0.7042254	0.7042254	0.7042254
0.7183099	0.6901408	0.7323944	0.8028169	0.6901408
0.6760563	0.6619718	0.7464789	0.7605634	0.7042254
0.6571429	0.6760563	0.8028169	0.7183099	0.7887324
0.7605634	0.7605634	0.7887324	0.7746479	0.7746479
0.6571429	0.6901408	0.7887324	0.8028169	0.8169014
0.8169014	0.7183099	0.8450704	0.7323944	0.8169014
0.7605634	0.8028169	0.7605634	0.7323944	0.7746479
0.7746479	0.7464789	0.7042254	0.6197183	0.6056338
0.6619718	0.6619718	0.9000000	0.8732394	0.8840580

---

0.8591549	0.8840580	0.9014085	0.9000000	0.8309859
0.9014085	0.8591549	0.8591549	0.6338028	0.5571429
0.7887324	0.6857143	0.7746479	0.7323944	0.7746479
0.6760563	0.7042254	0.7746479	0.6056338	0.7042254
0.7183099	0.7571429	0.7285714	0.7323944	0.8169014
0.7323944	0.8000000	0.7323944	0.7428571	0.8309859
0.6197183	0.6338028	0.6338028	0.6056338	0.6619718
0.7042254	0.7042254	0.7183099	0.6478873	0.8169014
0.7464789	0.7183099	0.7323944	0.7605634	0.7605634
0.7285714	0.8169014	0.7042254	0.8309859	0.7183099
0.7183099	0.7183099	0.8169014	0.8591549	0.8591549
0.8873239	0.9000000	0.7464789	0.6901408	0.8873239
0.8873239	0.7605634	0.9154930	0.9154930	0.9014085
0.9154930	0.8873239	1.0000000		



## 7. MATRIZ DE SIMILARIDAD OBTENIDA CON EL COEFICIENTE $S_J$ .

```
"A sample data matrix to test NTSYSpc
"There are 71 characters (rows) and 154 OTUs (columns)
"Columns and rows are labeled. There are missing values.
" SIMQUAL: input=C:\Mis documentos\lazara\datex813.NTS,
coeff=J
" by Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 153L 153 0
CECT 4231 CECT 4229 CECT 4228T CECT 4335 24 CECT 4333 CECT 4337 7 8 9 10
CECT 4821 CECT 4819 CECT 4816 CECT 4817 CECT 4818 CECT 4813 CECT 4815
CECT 4814 CECT 4256T CECT 4824 CECT 4825 CECT 4826 CECT 4827 24 25 26 27 28
29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 CECT 4830 CECT 4831 CECT 4832 CECT 4833 CECT
4834 CECT 4838 CECT 4835 CECT 4245T CECT 4246 CECT 4248 CECT 4249 CECT
4250 CECT 4251 CECT 4252 CECT 837T CECT 4257T CECT 4258 CECT 4259 CECT
4260 CECT 4261 CECT 4255T CECT 839T 62 CECT 4199T 63 CECT 4200 CECT 4220
CECT 4247 CECT 4224T CECT 4253 CECT 4221 CECT 4222 CECT 4223 CECT 838T
CECT 4226 CECT 4227 CECT 4232T CECT 4233 CECT 4234 CECT 4240T CECT 4254
CECT 894T CECT 4235 88 CECT 4341 87 CECT 4342T 89 CECT 4343 90 CECT 4853
CECT 4854 CECT 4855 CECT 4856 CECT 4243 CECT 4244 CECT 4486T CECT 4487T
99 100 102 103 104 105 106 CECT 4906 CECT 4902 CECT 4904 CECT 4901 CECT 4903
CECT 4907 CECT 4908 CECT 4909 CECT 4910 CECT 4911 CECT 4912 CECT 4933
CECT 4934 CECT 4935 CECT 4936 CECT 4937 123 124 125 126 127 128 129 130 131
CECT 398T 133 134 135 136 137 138A 138B CECT 4985 CECT 4986 CECT 4986 CECT
4987 CECT 4988 143 CECT CECT 4995 CECT 5025 CECT 5025 146 CECT 5026 CECT
5026 CECT 5027 CECT 5028 CECT 5029 CECT 5030
```

```
1.0000000
0.8378378 1.0000000
0.7692308 0.9166667 1.0000000
0.8461538 0.8461538 0.8250000 1.0000000
0.7750000 0.8205128 0.8461538 0.9230769 1.0000000
0.6500000 0.6923077 0.7179487 0.7073171 0.6829268
1.0000000
0.6037736 0.6346154 0.6226415 0.7115385 0.6603774
0.5660377 1.0000000
0.6346154 0.6346154 0.6226415 0.7115385 0.6603774
0.5370370 0.8888889 1.0000000
0.6226415 0.6226415 0.5818182 0.6666667 0.6181818
0.5000000 0.9074074 0.9433962 1.0000000
0.5849057 0.6470588 0.6037736 0.6603774 0.6415094
0.5185185 0.9056604 0.9056604 0.9615385 1.0000000
0.5961538 0.6600000 0.6153846 0.6730769 0.6538462
0.5283019 0.8867925 0.9230769 0.9423077 0.9800000
1.0000000
0.6052632 0.6052632 0.6315789 0.6250000 0.6410256
0.6388889 0.4444444 0.4716981 0.4363636 0.4528302
0.4615385 1.0000000
```

0.5918367	0.6595745	0.6808511	0.6734694	0.6875000
0.5200000	0.6964286	0.7272727	0.6842105	0.7090909
0.7222222	0.5106383	1.0000000		
0.5500000	0.5897436	0.6153846	0.5348837	0.5853659
0.6216216	0.4629630	0.4629630	0.4285714	0.4444444
0.4528302	0.6666667	0.6000000	1.0000000	
0.5208333	0.5869565	0.6086957	0.5400000	0.5833333
0.6136364	0.6363636	0.6071429	0.5964912	0.6181818
0.6296296	0.4347826	0.5660377	0.5581395	1.0000000
0.8108108	0.8108108	0.7894737	0.8205128	0.8421053
0.6250000	0.6153846	0.6153846	0.5740741	0.5961538
0.6078431	0.5789474	0.6739130	0.6486486	0.5652174
1.0000000				
0.6428571	0.7250000	0.7500000	0.6976744	0.7142857
0.5952381	0.5636364	0.5636364	0.5263158	0.5454545
0.5555556	0.5897436	0.5800000	0.5000000	0.5744681
0.6585366	1.0000000			
0.7750000	0.8205128	0.8461538	0.8292683	0.8500000
0.6046512	0.6296296	0.6603774	0.6181818	0.6111111
0.6226415	0.5609756	0.6875000	0.5476190	0.5833333
0.7500000	0.7142857	1.0000000		
0.8918919	0.8918919	0.8684211	0.8974359	0.8717949
0.7000000	0.6415094	0.6730769	0.6296296	0.6226415
0.6346154	0.6153846	0.6666667	0.5609756	0.5625000
0.8648649	0.7317073	0.8717949	1.0000000	
0.5531915	0.6222222	0.6818182	0.6041667	0.6521739
0.6136364	0.6666667	0.6666667	0.6250000	0.6481481
0.6603774	0.5000000	0.5961538	0.5952381	0.8139535
0.6000000	0.5744681	0.6170213	0.6304348	1.0000000
0.4800000	0.5744681	0.5306122	0.5600000	0.5714286
0.5000000	0.6545455	0.6545455	0.6727273	0.6981132
0.7115385	0.4255319	0.6153846	0.5111111	0.5490196
0.5208333	0.5625000	0.5098039	0.5200000	0.5490196
1.0000000				
0.4807692	0.5400000	0.5000000	0.5576923	0.5686275
0.4705882	0.7735849	0.7735849	0.7924528	0.8235294
0.8400000	0.4000000	0.6415094	0.4791667	0.5769231
0.5200000	0.4716981	0.5094340	0.5192308	0.6078431
0.8444444	1.0000000			
0.5000000	0.5625000	0.5200000	0.5800000	0.5918367
0.4897959	0.7692308	0.7692308	0.7884615	0.8200000
0.8367347	0.4166667	0.6037736	0.4680851	0.5686275
0.5416667	0.4901961	0.5294118	0.5400000	0.6000000
0.7608696	0.9090909	1.0000000		
0.5777778	0.6136364	0.5652174	0.5957447	0.5744681
0.5333333	0.6603774	0.6923077	0.6792453	0.7058824
0.7200000	0.4883721	0.7234043	0.5853659	0.5200000
0.5909091	0.5000000	0.5744681	0.5869565	0.5510204
0.7111111	0.7777778	0.7727273	1.0000000	

0.7750000	0.8205128	0.8461538	0.8750000	0.8974359
0.7250000	0.6296296	0.6296296	0.5892857	0.6111111
0.6226415	0.7297297	0.7234043	0.6250000	0.5833333
0.7948718	0.7142857	0.8048780	0.8717949	0.6521739
0.5400000	0.5384615	0.5294118	0.6086957	1.0000000
0.7750000	0.8684211	0.8461538	0.9230769	0.8974359
0.6829268	0.6923077	0.6923077	0.6481481	0.6730769
0.6862745	0.6410256	0.6875000	0.5476190	0.5510204
0.7948718	0.6744186	0.8500000	0.8717949	0.6170213
0.5714286	0.5686275	0.6250000	0.6086957	0.8500000
1.0000000				
0.7619048	0.8500000	0.8750000	0.9024390	0.9250000
0.7142857	0.6851852	0.6851852	0.6428571	0.6666667
0.6792453	0.6750000	0.7500000	0.6190476	0.6122449
0.7804878	0.7045455	0.8780488	0.8536585	0.6808511
0.5686275	0.5660377	0.5882353	0.6382979	0.9250000
0.9250000	1.0000000			
0.7750000	0.8684211	0.8461538	0.8750000	0.8500000
0.6829268	0.6603774	0.6603774	0.6181818	0.6415094
0.6538462	0.6000000	0.6530612	0.5476190	0.5510204
0.7948718	0.6744186	0.8500000	0.8947368	0.6170213
0.5400000	0.5384615	0.5600000	0.5744681	0.8500000
0.8974359	0.8780488	1.0000000		
0.7750000	0.8205128	0.8461538	0.9230769	1.0000000
0.6829268	0.6603774	0.6603774	0.6181818	0.6415094
0.6538462	0.6410256	0.6875000	0.5853659	0.5833333
0.8421053	0.7142857	0.8500000	0.8717949	0.6521739
0.5714286	0.5686275	0.5918367	0.5744681	0.8974359
0.8974359	0.9250000	0.8500000	1.0000000	
0.6666667	0.7567568	0.7368421	0.6829268	0.7000000
0.6578947	0.6078431	0.6078431	0.5660377	0.5882353
0.6000000	0.5675676	0.5957447	0.6857143	0.5909091
0.6842105	0.6500000	0.6585366	0.7179487	0.7073171
0.6511628	0.6086957	0.6000000	0.6190476	0.7000000
0.7000000	0.6904762	0.7000000	0.7000000	1.0000000
0.7380952	0.7804878	0.8048780	0.8333333	0.8536585
0.6136364	0.6363636	0.6666667	0.6250000	0.6181818
0.6296296	0.6097561	0.6938776	0.5581395	0.5294118
0.7142857	0.6444444	0.9000000	0.8500000	0.5918367
0.5490196	0.5471698	0.5384615	0.5833333	0.8536585
0.8536585	0.8809524	0.9000000	0.8536585	0.6666667
1.0000000				
0.7317073	0.8205128	0.8461538	0.8750000	0.8974359
0.6428571	0.6603774	0.6603774	0.6181818	0.6415094
0.6538462	0.6842105	0.6875000	0.5476190	0.5510204
0.7500000	0.7142857	0.8500000	0.8250000	0.6170213
0.5400000	0.5384615	0.5918367	0.5744681	0.8500000
0.9473684	0.9250000	0.8500000	0.8974359	0.6585366
0.8536585	1.0000000			

0.6750000	0.7179487	0.7435897	0.7317073	0.7500000
0.8055556	0.5555556	0.5272727	0.4912281	0.5090909
0.5185185	0.5789474	0.5400000	0.6052632	0.5652174
0.6923077	0.5813953	0.6279070	0.7250000	0.6363636
0.5208333	0.4901961	0.5102041	0.5217391	0.7500000
0.7073171	0.7380952	0.7073171	0.7500000	0.7297297
0.6363636	0.6666667	1.0000000		
0.6315789	0.7222222	0.7500000	0.6500000	0.6666667
0.7142857	0.4905660	0.5192308	0.4814815	0.5000000
0.5098039	0.6666667	0.5319149	0.6470588	0.5581395
0.6486486	0.5750000	0.6250000	0.6842105	0.5952381
0.5111111	0.4489796	0.4680851	0.4772727	0.6666667
0.7105263	0.6585366	0.6666667	0.6666667	0.7352941
0.6341463	0.6666667	0.6486486	1.0000000	
0.8250000	0.8250000	0.8500000	0.8780488	0.9000000
0.6904762	0.6363636	0.6666667	0.6250000	0.6181818
0.6296296	0.6500000	0.6600000	0.5581395	0.5600000
0.8000000	0.7209302	0.8536585	0.9473684	0.6250000
0.5192308	0.5185185	0.5384615	0.5510204	0.9000000
0.8536585	0.8809524	0.9000000	0.9000000	0.6666667
0.9024390	0.8536585	0.7142857	0.6341463	1.0000000
0.7317073	0.8205128	0.8461538	0.8750000	0.9473684
0.6428571	0.6603774	0.6603774	0.6181818	0.6415094
0.6538462	0.6410256	0.6875000	0.5853659	0.5833333
0.7948718	0.6744186	0.8500000	0.8250000	0.6521739
0.5714286	0.5686275	0.6250000	0.5744681	0.8500000
0.9473684	0.9250000	0.8500000	0.9473684	0.7000000
0.8536585	0.9473684	0.7073171	0.7105263	0.8536585
1.0000000				
0.8888889	0.8888889	0.8157895	0.8947368	0.8684211
0.7368421	0.6346154	0.6346154	0.6226415	0.6470588
0.6600000	0.6486486	0.6250000	0.5500000	0.5531915
0.8108108	0.6829268	0.7750000	0.8918919	0.5869565
0.5416667	0.5400000	0.5625000	0.5777778	0.8684211
0.8684211	0.8500000	0.8684211	0.8684211	0.7105263
0.7804878	0.8205128	0.7631579	0.6756757	0.8717949
0.8205128	1.0000000			
0.7804878	0.8250000	0.8500000	0.8333333	0.8536585
0.6904762	0.6363636	0.6666667	0.6250000	0.6181818
0.6296296	0.6923077	0.6938776	0.5952381	0.5918367
0.7560976	0.6818182	0.8536585	0.8750000	0.6595745
0.5192308	0.5185185	0.5686275	0.5833333	0.9000000
0.9000000	0.9268293	0.8536585	0.8536585	0.6666667
0.8571429	0.9000000	0.7142857	0.6750000	0.9024390
0.9000000	0.8250000	1.0000000		
0.5945946	0.6388889	0.5789474	0.5750000	0.5897436
0.6285714	0.4339623	0.4615385	0.4528302	0.4705882
0.4800000	0.6774194	0.4375000	0.6060606	0.4883721
0.5675676	0.5000000	0.5121951	0.5641026	0.5238095
0.4444444	0.4166667	0.4666667	0.4761905	0.5897436

0.6315789	0.6250000	0.5897436	0.5897436	0.6000000
0.5238095	0.6315789	0.6111111	0.6562500	0.5609756
0.6315789	0.6388889	0.6410256	1.0000000	
0.6666667	0.7567568	0.7368421	0.7250000	0.7000000
0.5750000	0.5471698	0.5769231	0.5370370	0.5576923
0.5686275	0.5675676	0.5625000	0.5526316	0.4893617
0.6842105	0.6500000	0.7000000	0.7631579	0.5909091
0.5106383	0.5102041	0.5319149	0.5813953	0.7000000
0.7435897	0.7317073	0.7435897	0.7000000	0.6756757
0.6666667	0.7435897	0.6410256	0.5945946	0.7073171
0.7000000	0.7105263	0.7073171	0.5555556	1.0000000
0.6666667	0.6666667	0.6904762	0.7209302	0.7380952
0.7435897	0.5535714	0.5535714	0.5172414	0.5357143
0.5454545	0.6578947	0.6000000	0.6410256	0.5625000
0.6428571	0.6136364	0.6590909	0.7142857	0.6304348
0.5510204	0.5192308	0.5098039	0.5869565	0.8250000
0.6976744	0.7674419	0.6976744	0.7380952	0.7179487
0.7045455	0.6976744	0.8157895	0.6410256	0.7441860
0.6976744	0.7500000	0.7441860	0.5641026	0.6750000
1.0000000				
0.4871795	0.5675676	0.5945946	0.5500000	0.5641026
0.6000000	0.4423077	0.4423077	0.4074074	0.4230769
0.4313725	0.6451613	0.4468085	0.6250000	0.4318182
0.5000000	0.5526316	0.5250000	0.5384615	0.5000000
0.4545455	0.4255319	0.4772727	0.4523810	0.5641026
0.6052632	0.6000000	0.5641026	0.5641026	0.5714286
0.5365854	0.6486486	0.5405405	0.5757576	0.5750000
0.6052632	0.5675676	0.6153846	0.6333333	0.5714286
0.5789474	1.0000000			
0.6136364	0.6511628	0.6363636	0.5957447	0.5744681
0.6046512	0.6296296	0.6603774	0.6481481	0.6730769
0.6862745	0.5238095	0.5576923	0.5116279	0.5833333
0.5909091	0.5000000	0.5744681	0.6363636	0.5833333
0.5400000	0.5686275	0.5918367	0.5744681	0.5744681
0.6444444	0.6041667	0.6444444	0.5744681	0.5813953
0.5833333	0.6086957	0.5217391	0.6666667	0.6170213
0.6086957	0.6511628	0.6170213	0.5500000	0.5454545
0.5208333	0.4878049	1.0000000		
0.6842105	0.7297297	0.6666667	0.7000000	0.7179487
0.6315789	0.5576923	0.5576923	0.5471698	0.5686275
0.5800000	0.6285714	0.5744681	0.6571429	0.5681818
0.7027027	0.5116279	0.6341463	0.6923077	0.6428571
0.5909091	0.5869565	0.6136364	0.6750000	0.7631579
0.7631579	0.7500000	0.7179487	0.7179487	0.7428571
0.6829268	0.7179487	0.7027027	0.6571429	0.6829268
0.7631579	0.7297297	0.7692308	0.7187500	0.6486486
0.7368421	0.5428571	0.5581395	1.0000000	
0.7894737	0.8378378	0.8157895	0.8461538	0.8205128
0.6500000	0.6037736	0.6037736	0.5636364	0.5849057
0.5961538	0.6486486	0.6595745	0.5500000	0.5208333

0.8108108	0.6829268	0.7750000	0.8918919	0.5869565
0.5102041	0.5098039	0.5306122	0.5777778	0.8684211
0.8684211	0.8048780	0.8205128	0.8205128	0.7105263
0.7804878	0.8205128	0.7179487	0.7222222	0.8250000
0.8205128	0.8378378	0.8250000	0.5526316	0.7567568
0.7500000	0.5263158	0.6136364	0.7297297	1.0000000
0.6153846	0.6578947	0.6842105	0.6341463	0.6923077
0.6486486	0.4814815	0.5094340	0.4727273	0.4905660
0.5000000	0.8064516	0.5208333	0.6764706	0.5111111
0.6315789	0.5609756	0.6097561	0.6250000	0.5813953
0.4375000	0.4117647	0.4583333	0.4666667	0.6923077
0.6923077	0.7250000	0.6500000	0.6923077	0.6216216
0.6190476	0.7368421	0.6315789	0.7272727	0.6585366
0.7368421	0.6578947	0.7435897	0.8620690	0.5789474
0.6250000	0.6562500	0.5714286	0.6857143	0.6153846
1.0000000				
0.6585366	0.7000000	0.7250000	0.6744186	0.7317073
0.6500000	0.5740741	0.5740741	0.5636364	0.5849057
0.5660377	0.6944444	0.5918367	0.6756757	0.5531915
0.6750000	0.6046512	0.6511628	0.6666667	0.6222222
0.5102041	0.4807692	0.5000000	0.5434783	0.7317073
0.6904762	0.7619048	0.6904762	0.7317073	0.7105263
0.6590909	0.6904762	0.6750000	0.6756757	0.6976744
0.7317073	0.7000000	0.7380952	0.7352941	0.5853659
0.6666667	0.5675676	0.5434783	0.6842105	0.6190476
0.8529412	1.0000000			
0.7948718	0.8421053	0.7750000	0.8048780	0.7804878
0.6585366	0.6415094	0.6730769	0.6603774	0.6538462
0.6666667	0.6153846	0.6326531	0.5238095	0.5306122
0.7250000	0.6511628	0.7804878	0.8461538	0.5625000
0.5510204	0.5800000	0.5714286	0.6222222	0.8250000
0.8250000	0.8095238	0.8250000	0.7804878	0.6750000
0.8292683	0.8250000	0.6428571	0.6410256	0.8292683
0.7804878	0.8421053	0.8292683	0.6052632	0.7179487
0.6744186	0.5384615	0.6222222	0.7368421	0.7948718
0.6250000	0.6279070	1.0000000		
0.7750000	0.8205128	0.7560976	0.7857143	0.7619048
0.6046512	0.6603774	0.6923077	0.7115385	0.7058824
0.7200000	0.5609756	0.6530612	0.5476190	0.5200000
0.7073171	0.6000000	0.8048780	0.8250000	0.5833333
0.6041667	0.6326531	0.6250000	0.6818182	0.7619048
0.8048780	0.7906977	0.7619048	0.7619048	0.7000000
0.8095238	0.7619048	0.5909091	0.6666667	0.7674419
0.7619048	0.7750000	0.7674419	0.5500000	0.7000000
0.6590909	0.4878049	0.6444444	0.7179487	0.7750000
0.5714286	0.6136364	0.8717949	1.0000000	
0.5526316	0.5526316	0.5384615	0.5365854	0.5500000
0.5833333	0.4615385	0.4901961	0.4807692	0.5000000
0.5102041	0.5294118	0.4375000	0.5142857	0.4545455
0.5675676	0.4285714	0.4418605	0.5250000	0.4545455

0.4772727	0.4468085	0.5000000	0.4761905	0.5121951
0.5500000	0.5116279	0.5121951	0.5500000	0.5135135
0.4545455	0.5121951	0.5675676	0.6060606	0.5238095
0.5500000	0.5945946	0.5238095	0.7241379	0.4358974
0.4878049	0.4848485	0.6315789	0.5714286	0.5128205
0.6363636	0.5945946	0.4878049	0.4761905	1.0000000
0.5714286	0.5714286	0.5135135	0.5526316	0.5675676
0.5588235	0.4117647	0.4117647	0.4038462	0.4200000
0.4285714	0.6000000	0.3829787	0.5312500	0.3953488
0.5882353	0.4358974	0.4500000	0.5405405	0.4285714
0.3863636	0.3617021	0.4090909	0.3809524	0.5263158
0.5675676	0.5250000	0.5405405	0.5675676	0.5294118
0.4750000	0.5675676	0.5428571	0.5806452	0.5526316
0.5675676	0.6176471	0.5384615	0.6428571	0.4857143
0.5000000	0.5517241	0.5000000	0.5937500	0.5277778
0.6666667	0.5714286	0.5405405	0.4871795	0.5862069
1.0000000				
0.5833333	0.5833333	0.5263158	0.5641026	0.5789474
0.5714286	0.4230769	0.4509804	0.4423077	0.4600000
0.4693878	0.6666667	0.3958333	0.5454545	0.3777778
0.6000000	0.5263158	0.4634146	0.5526316	0.4090909
0.4000000	0.4042553	0.4545455	0.4285714	0.5384615
0.5789474	0.5365854	0.5384615	0.5789474	0.5000000
0.4761905	0.5789474	0.5135135	0.5937500	0.5500000
0.5789474	0.6285714	0.5500000	0.7142857	0.5000000
0.4750000	0.6206897	0.5384615	0.5588235	0.5405405
0.6774194	0.5833333	0.5945946	0.5384615	0.6000000
0.7600000	1.0000000			
0.6097561	0.6500000	0.6341463	0.6666667	0.6829268
0.6842105	0.5961538	0.5961538	0.5555556	0.5769231
0.5882353	0.6388889	0.5833333	0.6666667	0.5434783
0.6666667	0.5227273	0.6046512	0.6585366	0.6136364
0.5652174	0.5957447	0.6222222	0.6428571	0.7250000
0.7250000	0.7142857	0.6829268	0.6829268	0.7500000
0.6511628	0.7250000	0.7105263	0.6666667	0.6511628
0.7250000	0.6923077	0.7317073	0.6764706	0.6578947
0.7435897	0.6000000	0.6046512	0.8235294	0.6923077
0.6944444	0.6500000	0.7435897	0.6829268	0.5405405
0.5588235	0.5714286	1.0000000		
0.5135135	0.5555556	0.5405405	0.5384615	0.5526316
0.6363636	0.4038462	0.4038462	0.3962264	0.4117647
0.4200000	0.5806452	0.4347826	0.5625000	0.4523810
0.5277778	0.4615385	0.4390244	0.5263158	0.5250000
0.4418605	0.4130435	0.4318182	0.4390244	0.5945946
0.5526316	0.5500000	0.5128205	0.5526316	0.6060606
0.4878049	0.5526316	0.6666667	0.6129032	0.5250000
0.5526316	0.6000000	0.5641026	0.6785714	0.4722222
0.6111111	0.5862069	0.4750000	0.6774194	0.5555556
0.5937500	0.5135135	0.5675676	0.5128205	0.5666667
0.6538462	0.6666667	0.6875000	1.0000000	

0.6382979	0.7111111	0.7333333	0.7608696	0.8181818
0.5957447	0.6785714	0.7090909	0.6666667	0.6909091
0.7037037	0.5555556	0.8510638	0.6511628	0.5769231
0.7674419	0.5918367	0.7391304	0.7173913	0.6078431
0.6274510	0.6226415	0.6470588	0.6666667	0.7777778
0.7777778	0.8444444	0.7391304	0.8181818	0.6086957
0.7446809	0.7777778	0.6521739	0.5777778	0.7446809
0.8181818	0.7111111	0.7826087	0.5454545	0.6086957
0.6458333	0.5227273	0.6000000	0.6590909	0.6739130
0.6363636	0.6739130	0.6808511	0.6666667	0.5454545
0.4883721	0.5000000	0.6666667	0.5116279	1.0000000
0.6382979	0.7111111	0.7333333	0.7608696	0.7777778
0.5957447	0.6785714	0.7090909	0.6666667	0.6909091
0.7037037	0.5555556	0.8510638	0.6136364	0.5471698
0.7272727	0.6250000	0.7391304	0.7173913	0.5769231
0.5961538	0.5925926	0.6153846	0.6666667	0.7777778
0.7777778	0.8444444	0.7391304	0.7777778	0.5744681
0.7446809	0.7777778	0.6170213	0.5434783	0.7446809
0.7777778	0.7111111	0.7826087	0.5454545	0.6086957
0.6458333	0.5581395	0.6000000	0.6222222	0.6739130
0.6000000	0.6382979	0.6808511	0.6666667	0.5454545
0.4545455	0.5000000	0.6304348	0.5116279	0.9545455
1.0000000				
0.6382979	0.7111111	0.7333333	0.7608696	0.7777778
0.5957447	0.6785714	0.7090909	0.6666667	0.6909091
0.7037037	0.5555556	0.8510638	0.6136364	0.5471698
0.7272727	0.6250000	0.7391304	0.7173913	0.5769231
0.5961538	0.5925926	0.6153846	0.6666667	0.7777778
0.7777778	0.8444444	0.7391304	0.7777778	0.5744681
0.7446809	0.7777778	0.6170213	0.5434783	0.7446809
0.7777778	0.7111111	0.7826087	0.5454545	0.6086957
0.6458333	0.5581395	0.6000000	0.6222222	0.6739130
0.6000000	0.6382979	0.6808511	0.6666667	0.5454545
0.4545455	0.5000000	0.6304348	0.5116279	0.9545455
1.0000000	1.0000000			
0.5714286	0.6382979	0.6595745	0.6875000	0.7391304
0.5625000	0.6491228	0.6785714	0.6379310	0.6607143
0.6727273	0.5217391	0.8125000	0.6136364	0.5769231
0.6888889	0.5600000	0.6666667	0.6458333	0.6078431
0.6274510	0.6226415	0.6153846	0.6326531	0.7021277
0.7021277	0.7659574	0.6666667	0.7391304	0.5744681
0.6734694	0.7391304	0.6170213	0.5106383	0.6734694
0.7391304	0.6382979	0.7083333	0.5454545	0.6086957
0.6122449	0.5227273	0.5384615	0.6222222	0.6041667
0.6000000	0.6041667	0.6458333	0.6000000	0.5111111
0.4545455	0.4666667	0.6666667	0.5116279	0.9111111
0.8695652	0.8695652	1.0000000		
0.6250000	0.6956522	0.7173913	0.7446809	0.7608696
0.5510204	0.6964286	0.7592593	0.7142857	0.7407407
0.7547170	0.5434783	0.8333333	0.6000000	0.5370370



0.7111111	0.5800000	0.7234043	0.7021277	0.5961538
0.6470588	0.6415094	0.6346154	0.6530612	0.7234043
0.7608696	0.7872340	0.7234043	0.7608696	0.5957447
0.7291667	0.7608696	0.5714286	0.5652174	0.7291667
0.7608696	0.6956522	0.7291667	0.5000000	0.6304348
0.6326531	0.5454545	0.6200000	0.6086957	0.6595745
0.5869565	0.6250000	0.6666667	0.6875000	0.5333333
0.4772727	0.4888889	0.6170213	0.4666667	0.8913043
0.8913043	0.8913043	0.8913043	1.0000000	
0.6888889	0.7272727	0.7111111	0.7391304	0.7555556
0.6086957	0.6607143	0.6909091	0.6785714	0.7037037
0.7169811	0.5681818	0.8297872	0.6279070	0.5576923
0.7045455	0.5714286	0.7173913	0.6956522	0.5576923
0.6078431	0.6037736	0.6274510	0.6808511	0.7555556
0.7555556	0.8222222	0.7173913	0.7555556	0.5869565
0.7234043	0.7555556	0.6304348	0.5555556	0.7234043
0.7555556	0.7674419	0.7608696	0.5581395	0.5869565
0.6595745	0.5348837	0.6458333	0.6363636	0.6521739
0.6136364	0.6521739	0.6956522	0.6808511	0.5581395
0.5000000	0.5116279	0.6444444	0.5238095	0.9318182
0.9318182	0.9318182	0.8478261	0.8695652	1.0000000
0.5416667	0.6086957	0.6666667	0.5918367	0.6382979
0.6000000	0.6851852	0.6250000	0.6140351	0.6363636
0.6481481	0.4782609	0.5849057	0.5454545	0.7954545
0.5869565	0.5833333	0.6041667	0.6304348	0.8372093
0.5384615				
0.5961538	0.5882353	0.5098039	0.6382979	0.6041667
0.6666667	0.6382979	0.6382979	0.6511628	0.6122449
0.6250000	0.6222222	0.5454545	0.6458333	0.6382979
0.5744681	0.6458333	0.5000000	0.5652174	0.5833333
0.4772727	0.5714286	0.5909091	0.5744681	0.5555556
0.6086957	0.5714286	0.5714286	0.4130435	0.4186047
0.3913043	0.5869565	0.4651163	0.5961538	0.5660377
0.5660377	0.6470588	0.5849057	0.5471698	1.0000000
0.5555556	0.5849057	0.6037736	0.6296296	0.6111111
0.5185185	0.8363636	0.9056604	0.8888889	0.8867925
0.9038462	0.4528302	0.6785714	0.4181818	0.6181818
0.5660377	0.5178571	0.6111111	0.6226415	0.6481481
0.6363636	0.7547170	0.7500000	0.6415094	0.5818182
0.6415094	0.6363636	0.6111111	0.6111111	0.5576923
0.6181818	0.6111111	0.5090909	0.5000000	0.6181818
0.6111111	0.5849057	0.6181818	0.4150943	0.5283019
0.5087719	0.3962264	0.6415094	0.5094340	0.5555556
0.4629630	0.5272727	0.6226415	0.6730769	0.4705882
0.3653846	0.4038462	0.5471698	0.3846154	0.6607143
0.6607143	0.6607143	0.6315789	0.7090909	0.6428571
0.6363636	1.0000000			
0.5957447	0.6666667	0.6888889	0.7173913	0.7333333
0.6976744	0.7358491	0.6727273	0.6607143	0.6851852
0.6981132	0.4782609	0.6666667	0.5681818	0.6326531

0.6818182	0.5510204	0.6595745	0.6739130	0.6666667
0.6530612	0.7142857	0.7083333	0.6956522	0.6956522
0.7333333	0.7608696	0.6956522	0.7333333	0.6744186
0.6666667	0.6956522	0.7209302	0.5681818	0.6666667
0.7333333	0.6666667	0.7021277	0.5348837	0.6000000
0.6382979	0.4772727	0.5918367	0.6904762	0.6304348
0.5555556	0.6304348	0.6739130	0.6956522	0.5000000
0.4418605	0.4545455	0.7380952	0.5365854	0.7142857
0.6800000	0.6800000	0.6800000	0.6346154	0.6600000
0.6875000	0.6851852	1.0000000		
0.6086957	0.6818182	0.6304348	0.6956522	0.7111111
0.6363636	0.7169811	0.6545455	0.6727273	0.6981132
0.7115385	0.4565217	0.6470588	0.5454545	0.6122449
0.6590909	0.5306122	0.6382979	0.6521739	0.6122449
0.6666667	0.7291667	0.7234043	0.7111111	0.6739130
0.7111111	0.7391304	0.6739130	0.7111111	0.6511628
0.6458333	0.6739130	0.6590909	0.5111111	0.6458333
0.7111111	0.6818182	0.6808511	0.5476190	0.5777778
0.6170213	0.4545455	0.5714286	0.7073171	0.6086957
0.5333333	0.6086957	0.6888889	0.7111111	0.4772727
0.4523810	0.4651163	0.7142857	0.5121951	0.6938776
0.6600000	0.6600000	0.6600000	0.6153846	0.6734694
0.6326531	0.6363636	0.9285714	1.0000000	
0.5869565	0.6590909	0.6086957	0.6739130	0.6888889
0.6136364	0.6981132	0.6363636	0.6545455	0.6792453
0.6923077	0.5000000	0.6600000	0.5581395	0.5918367
0.6363636	0.5416667	0.6170213	0.6304348	0.5918367
0.6808511	0.7446809	0.7021277	0.7272727	0.6888889
0.6888889	0.7173913	0.6521739	0.6888889	0.6666667
0.6595745	0.6888889	0.6363636	0.5227273	0.6250000
0.6888889	0.6590909	0.6595745	0.5609756	0.5909091
0.6304348	0.4651163	0.5510204	0.7250000	0.6222222
0.5454545	0.5869565	0.7441860	0.7272727	0.4545455
0.4634146	0.4761905	0.7750000	0.5641026	0.6734694
0.6400000	0.6400000	0.6734694	0.5961538	0.6530612
0.6326531	0.6181818	0.9047619	0.9268293	1.0000000
0.6304348	0.7045455	0.6521739	0.7173913	0.7333333
0.6590909	0.7358491	0.6727273	0.6909091	0.7169811
0.7307692	0.4782609	0.6666667	0.5681818	0.6326531
0.6818182	0.5510204	0.6595745	0.6739130	0.6326531
0.6875000	0.7500000	0.7446809	0.7333333	0.6956522
0.7333333	0.7608696	0.6956522	0.7333333	0.6744186
0.6666667	0.6956522	0.6818182	0.5333333	0.6666667
0.7333333	0.7045455	0.7021277	0.5714286	0.6000000
0.6382979	0.4772727	0.5918367	0.7317073	0.6304348
0.5555556	0.6304348	0.7111111	0.7333333	0.5000000
0.4761905	0.4883721	0.7380952	0.5365854	0.7142857
0.6800000	0.6800000	0.6800000	0.6346154	0.6938776
0.6530612	0.6545455	0.9523810	0.9756098	0.9512195
1.0000000				

0.6000000	0.6744186	0.6590909	0.7272727	0.7441860
0.6279070	0.6181818	0.5614035	0.5517241	0.5714286
0.5818182	0.5116279	0.6400000	0.6097561	0.5400000
0.6904762	0.5208333	0.6666667	0.6818182	0.6041667
0.5600000	0.5576923	0.6122449	0.5625000	0.7045455
0.7857143	0.7727273	0.7045455	0.7441860	0.6428571
0.6739130	0.7441860	0.7750000	0.5714286	0.6739130
0.7857143	0.6744186	0.7500000	0.5750000	0.6428571
0.7209302	0.5500000	0.5000000	0.7435897	0.7142857
0.5952381	0.6000000	0.6444444	0.6666667	0.4651163
0.5128205	0.4878049	0.7073171	0.5789474	0.7608696
0.7234043	0.7234043	0.7234043	0.6734694	0.7021277
0.6250000	0.5438596	0.7555556	0.7333333	0.7111111
0.7555556	1.0000000			
0.5400000	0.6041667	0.5600000	0.5882353	0.5686275
0.5306122	0.7735849	0.7735849	0.7924528	0.8235294
0.8400000	0.4285714	0.7400000	0.5106383	0.6078431
0.5510204	0.4716981	0.5686275	0.5800000	0.6400000
0.7291667	0.8695652	0.8260870	0.8604651	0.6000000
0.6000000	0.6274510	0.5686275	0.5686275	0.6086957
0.5769231	0.5686275	0.5200000	0.4791667	0.5471698
0.5686275	0.5714286	0.5769231	0.4468085	0.5416667
0.5800000	0.4255319	0.5686275	0.6222222	0.5714286
0.4400000	0.5098039	0.6122449	0.7021277	0.4468085
0.3617021	0.3750000	0.6304348	0.4444444	0.6538462
0.6538462	0.6538462	0.6538462	0.6730769	0.6666667
0.6274510	0.7547170	0.7142857	0.7291667	0.7446809
0.7500000	0.5882353	1.0000000		
0.4250000	0.4615385	0.4146341	0.3863636	0.3953488
0.3414634	0.3962264	0.3962264	0.3888889	0.4038462
0.4117647	0.3888889	0.4565217	0.5454545	0.3191489
0.4736842	0.3488372	0.3636364	0.4047619	0.3478261
0.5000000	0.4666667	0.4883721	0.5384615	0.3953488
0.4285714	0.4000000	0.3953488	0.3953488	0.5000000
0.3777778	0.4285714	0.4000000	0.4166667	0.3777778
0.4285714	0.4250000	0.4090909	0.4117647	0.4594595
0.4047619	0.4242424	0.4285714	0.5142857	0.4250000
0.4054054	0.3902439	0.4390244	0.4285714	0.4545455
0.4666667	0.4375000	0.5277778	0.4516129	0.5000000
0.4666667	0.4666667	0.5348837	0.5227273	0.5116279
0.3617021	0.3518519	0.3913043	0.4000000	0.4418605
0.4222222	0.4523810	0.4666667	1.0000000	
0.4705882	0.5306122	0.5200000	0.5490196	0.5600000
0.5208333	0.7037037	0.7037037	0.7222222	0.7500000
0.7647059	0.3877551	0.6346154	0.4680851	0.6000000
0.5102041	0.4339623	0.5000000	0.5098039	0.6000000
0.6875000	0.7500000	0.7446809	0.7333333	0.5600000
0.5600000	0.5882353	0.5294118	0.5600000	0.6000000
0.5384615	0.5294118	0.5416667	0.4680851	0.5094340
0.5600000	0.5306122	0.5384615	0.4347826	0.5000000

0.5400000	0.3541667	0.5918367	0.6136364	0.5000000
0.4285714	0.5000000	0.5714286	0.6250000	0.4666667
0.3478261	0.3617021	0.6222222	0.4651163	0.6470588
0.6153846	0.6153846	0.6153846	0.6037736	0.6274510
0.5882353	0.7500000	0.7446809	0.7234043	0.7391304
0.7446809	0.5800000	0.7500000	0.4222222	1.0000000
0.4727273	0.5000000	0.4909091	0.5454545	0.5272727
0.4905660	0.7818182	0.7500000	0.7678571	0.7636364
0.7454545	0.3703704	0.6545455	0.4150943	0.5357143
0.4814815	0.4385965	0.5272727	0.5370370	0.5636364
0.6415094	0.7647059	0.7254902	0.6800000	0.5555556
0.5555556	0.5818182	0.5272727	0.5272727	0.5294118
0.5636364	0.5272727	0.4814815	0.3888889	0.5357143
0.5272727	0.5000000	0.5636364	0.3584906	0.4716981
0.5090909	0.3653846	0.4736842	0.5098039	0.5000000
0.3818182	0.4727273	0.5660377	0.5849057	0.3584906
0.2830189	0.2962963	0.5490196	0.3529412	0.6071429
0.6071429	0.6071429	0.6363636	0.6250000	0.5892857
0.6111111	0.7321429	0.6603774	0.6415094	0.6538462
0.6603774	0.5454545	0.8000000	0.4285714	0.7254902
1.0000000				
0.4181818	0.4716981	0.4363636	0.4909091	0.5000000
0.4339623	0.7272727	0.6964286	0.7142857	0.7407407
0.7547170	0.3396226	0.6000000	0.4117647	0.5660377
0.4528302	0.4107143	0.4464286	0.4545455	0.5961538
0.6800000	0.8125000	0.7708333	0.6875000	0.5000000
0.5000000	0.5272727	0.4727273	0.5000000	0.5000000
0.4821429	0.4727273	0.4528302	0.3584906	0.4561404
0.5000000	0.4716981	0.4821429	0.3529412	0.4423077
0.4545455	0.3333333	0.4727273	0.5102041	0.4444444
0.3518519	0.4181818	0.5094340	0.5283019	0.3529412
0.2745098	0.3137255	0.5200000	0.3469388	0.5818182
0.5535714	0.5535714	0.6111111	0.5714286	0.5636364
0.6153846	0.6785714	0.6346154	0.6470588	0.6600000
0.6666667	0.5185185	0.7755102	0.4565217	0.7708333
0.8571429	1.0000000			
0.4107143	0.4629630	0.4814815	0.5090909	0.5185185
0.4807692	0.7454545	0.7142857	0.7017544	0.7272727
0.7407407	0.3333333	0.6181818	0.4038462	0.5849057
0.4716981	0.4285714	0.4642857	0.4727273	0.6153846
0.6666667	0.7600000	0.7200000	0.6400000	0.5185185
0.5185185	0.5454545	0.4909091	0.5185185	0.5200000
0.5000000	0.4909091	0.5000000	0.4038462	0.4736842
0.5185185	0.4629630	0.5000000	0.3461538	0.4339623
0.4727273	0.3269231	0.4909091	0.5000000	0.4629630
0.3703704	0.4363636	0.5000000	0.5185185	0.3725490
0.2692308	0.2830189	0.5400000	0.3673469	0.6000000
0.5714286	0.5714286	0.6296296	0.5892857	0.5535714
0.6666667	0.7272727	0.6862745	0.6346154	0.6470588

0.6538462	0.5370370	0.7600000	0.4166667	0.7916667
0.8775510	0.8936170	1.0000000		
0.4038462	0.4600000	0.4800000	0.5098039	0.5200000
0.4489796	0.7307692	0.7307692	0.7169811	0.7450980
0.7600000	0.3469388	0.5961538	0.3958333	0.5294118
0.4693878	0.4230769	0.4615385	0.4705882	0.5918367
0.6458333	0.7826087	0.7391304	0.6170213	0.4901961
0.5200000	0.5192308	0.4901961	0.5200000	0.5555556
0.5000000	0.5200000	0.4693878	0.4255319	0.4716981
0.5200000	0.4600000	0.4716981	0.3617021	0.5217391
0.4705882	0.3404255	0.4901961	0.5000000	0.4600000
0.3877551	0.4313725	0.5306122	0.5510204	0.3913043
0.3333333	0.3191489	0.5777778	0.3863636	0.5769231
0.5471698	0.5471698	0.6078431	0.5961538	0.5283019
0.6000000	0.7450980	0.6666667	0.6122449	0.6595745
0.6326531	0.5098039	0.7446809	0.4090909	0.7777778
0.7916667	0.7659574	0.8260870	1.0000000	
0.6078431	0.6734694	0.6274510	0.6862745	0.6666667
0.5384615	0.8333333	0.8333333	0.8518519	0.8846154
0.9019608	0.4705882	0.7037037	0.4615385	0.5818182
0.6200000	0.5660377	0.6346154	0.6470588	0.6111111
0.7254902	0.8200000	0.7800000	0.7000000	0.6346154
0.7000000	0.6923077	0.6666667	0.6666667	0.6122449
0.6415094	0.6666667	0.5283019	0.5200000	0.6415094
0.6666667	0.6734694	0.6415094	0.4897959	0.5800000
0.5555556	0.4400000	0.7000000	0.5918367	0.6078431
0.5098039	0.5769231	0.6800000	0.7346939	0.5208333
0.4375000	0.4791667	0.6000000	0.4285714	0.6851852
0.6851852	0.6851852	0.6851852	0.7692308	0.6981132
0.6296296	0.8148148	0.7450980	0.7600000	0.7400000
0.7800000	0.5925926	0.7843137	0.4489796	0.7115385
0.7272727	0.7037037	0.6909091	0.7058824	1.0000000
0.4000000	0.4583333	0.4489796	0.4800000	0.4897959
0.4468085	0.6111111	0.6111111	0.6000000	0.6226415
0.6346154	0.3404255	0.5686275	0.4545455	0.5000000
0.4680851	0.3396226	0.4313725	0.4400000	0.5306122
0.5200000	0.6458333	0.6382979	0.6222222	0.4897959
0.4897959	0.5200000	0.4600000	0.4897959	0.4565217
0.4705882	0.4600000	0.4680851	0.3913043	0.4423077
0.4897959	0.4583333	0.4705882	0.3555556	0.4565217
0.4693878	0.3333333	0.4897959	0.5348837	0.4285714
0.3541667	0.4000000	0.5000000	0.5208333	0.3863636
0.2954545	0.3409091	0.5454545	0.4146341	0.5800000
0.5490196	0.5490196	0.5490196	0.5384615	0.5600000
0.4901961	0.5925926	0.6041667	0.5833333	0.5957447
0.6041667	0.5102041	0.6458333	0.4047619	0.7111111
0.5961538	0.6666667	0.6530612	0.6304348	0.5849057
1.0000000				
0.3725490	0.4285714	0.4489796	0.4800000	0.4897959
0.4468085	0.6111111	0.6111111	0.5714286	0.5925926

0.6037736	0.3695652	0.5686275	0.4545455	0.4705882
0.4680851	0.3396226	0.4313725	0.4400000	0.5306122
0.4901961	0.6122449	0.6382979	0.5869565	0.4897959
0.5208333	0.5200000	0.4600000	0.4897959	0.4565217
0.4705882	0.4897959	0.4680851	0.4222222	0.4423077
0.5208333	0.4285714	0.5000000	0.3555556	0.4565217
0.4693878	0.3636364	0.4897959	0.5348837	0.4583333
0.3829787	0.4000000	0.4693878	0.4897959	0.3863636
0.2954545	0.3409091	0.5813953	0.4146341	0.5800000
0.5490196	0.5490196	0.5490196	0.5384615	0.5294118
0.4901961	0.5925926	0.6041667	0.5510204	0.5625000
0.5714286	0.5416667	0.6122449	0.4047619	0.6739130
0.5961538	0.6326531	0.6530612	0.6304348	0.5555556
0.9459459	1.0000000			
0.3773585	0.4313725	0.4230769	0.4528302	0.4615385
0.4200000	0.6363636	0.6071429	0.6250000	0.6481481
0.6603774	0.3200000	0.5660377	0.3958333	0.5294118
0.4400000	0.3214286	0.4074074	0.4150943	0.5294118
0.5192308	0.6400000	0.6000000	0.5510204	0.4615385
0.4615385	0.4905660	0.4339623	0.4615385	0.4285714
0.4444444	0.4615385	0.4400000	0.3673469	0.4181818
0.4615385	0.4313725	0.4444444	0.3617021	0.4285714
0.4423077	0.3125000	0.4615385	0.5000000	0.4038462
0.3600000	0.3773585	0.5000000	0.5200000	0.3617021
0.3043478	0.3191489	0.5434783	0.4186047	0.5471698
0.5185185	0.5185185	0.5769231	0.5370370	0.5283019
0.5384615	0.6481481	0.6000000	0.5800000	0.6250000
0.6000000	0.5098039	0.6734694	0.3777778	0.7391304
0.6226415	0.6600000	0.6800000	0.6956522	0.6111111
0.8750000	0.8292683	1.0000000		
0.5581395	0.5952381	0.6190476	0.5777778	0.5909091
0.4772727	0.5272727	0.5555556	0.5178571	0.5370370
0.5471698	0.4634146	0.5098039	0.4523810	0.5652174
0.5714286	0.6190476	0.6279070	0.6046512	0.6000000
0.4600000	0.4339623	0.4509804	0.4893617	0.5909091
0.5909091	0.6222222	0.5909091	0.5909091	0.5609756
0.5652174	0.5909091	0.4347826	0.5250000	0.6000000
0.5909091	0.5581395	0.6000000	0.4146341	0.6000000
0.5333333	0.4250000	0.5217391	0.5000000	0.5581395
0.5121951	0.5581395	0.5333333	0.5555556	0.3488372
0.3846154	0.3658537	0.4444444	0.3095238	0.5200000
0.5200000	0.5200000	0.4901961	0.5714286	0.5000000
0.5531915	0.5090909	0.4800000	0.4600000	0.4400000
0.4800000	0.4489796	0.4615385	0.3333333	0.4800000
0.4814815	0.4528302	0.4716981	0.4400000	0.5576923
0.3529412	0.3529412	0.3333333	1.0000000	
0.4634146	0.5000000	0.5250000	0.4883721	0.5000000
0.3809524	0.4259259	0.4259259	0.4181818	0.4339623
0.4423077	0.3589744	0.4583333	0.3500000	0.4772727
0.4390244	0.4523810	0.5750000	0.4761905	0.4444444

0.4042553	0.4081633	0.3958333	0.4651163	0.5000000
0.5000000	0.5348837	0.5000000	0.5000000	0.4615385
0.5476190	0.5000000	0.3720930	0.3846154	0.4772727
0.5000000	0.4634146	0.4772727	0.3076923	0.4250000
0.4090909	0.2820513	0.4000000	0.4358974	0.4634146
0.3414634	0.4285714	0.4761905	0.5000000	0.2750000
0.2051282	0.2250000	0.3488372	0.2307692	0.4375000
0.4375000	0.4375000	0.4375000	0.4583333	0.4468085
0.5000000	0.4339623	0.4565217	0.4347826	0.4444444
0.4565217	0.3913043	0.4375000	0.2894737	0.4565217
0.4897959	0.4583333	0.4791667	0.4130435	0.4800000
0.3191489	0.2916667	0.3000000	0.5945946	1.0000000
0.3500000	0.4210526	0.3750000	0.3488372	0.3255814
0.3684211	0.3653846	0.3653846	0.3584906	0.3725490
0.3800000	0.3823529	0.3617021	0.4117647	0.3111111
0.3589744	0.3414634	0.3255814	0.3658537	0.3111111
0.3953488	0.3695652	0.4186047	0.4250000	0.3255814
0.3902439	0.3636364	0.3571429	0.3255814	0.3783784
0.3111111	0.3902439	0.3250000	0.3714286	0.3409091
0.3571429	0.3846154	0.3720930	0.4062500	0.4571429
0.3333333	0.5172414	0.4615385	0.3513514	0.3500000
0.3611111	0.3170732	0.3658537	0.3571429	0.4062500
0.4137931	0.4333333	0.4054054	0.4000000	0.4000000
0.4318182	0.4318182	0.4000000	0.4222222	0.4418605
0.2978723	0.3461538	0.3260870	0.3636364	0.3409091
0.3555556	0.3488372	0.4000000	0.5357143	0.3260870
0.3400000	0.3333333	0.3000000	0.3409091	0.3877551
0.3333333	0.3333333	0.3111111	0.2926829	0.2105263
1.0000000				
0.3500000	0.4210526	0.3750000	0.3488372	0.3255814
0.3684211	0.3653846	0.3653846	0.3584906	0.3725490
0.3800000	0.3428571	0.3617021	0.4117647	0.3111111
0.3589744	0.3414634	0.3255814	0.3658537	0.3111111
0.3953488	0.3695652	0.3863636	0.4250000	0.3255814
0.3571429	0.3636364	0.3571429	0.3255814	0.3783784
0.3111111	0.3571429	0.3250000	0.3333333	0.3409091
0.3255814	0.3846154	0.3409091	0.3636364	0.4571429
0.3333333	0.4666667	0.4250000	0.3157895	0.3170732
0.3243243	0.3170732	0.3658537	0.3571429	0.3636364
0.3666667	0.3870968	0.3684211	0.3548387	0.4000000
0.4318182	0.4318182	0.4000000	0.4222222	0.4418605
0.2978723	0.3461538	0.3260870	0.3333333	0.3409091
0.3555556	0.3181818	0.4000000	0.4827586	0.3555556
0.3673469	0.3617021	0.3265306	0.3720930	0.3877551
0.4000000	0.3658537	0.3720930	0.3250000	0.2432432
0.8181818	1.0000000			
0.5581395	0.5952381	0.5454545	0.5777778	0.5909091
0.4444444	0.5660377	0.5961538	0.5849057	0.6078431
0.6200000	0.4634146	0.6170213	0.5641026	0.4791667
0.6097561	0.4565217	0.5555556	0.5813953	0.5106383

0.7142857	0.7045455	0.7380952	0.8157895	0.5555556
0.6279070	0.5869565	0.5909091	0.5909091	0.6153846
0.6000000	0.5909091	0.5000000	0.5250000	0.5652174
0.6279070	0.5581395	0.5652174	0.4871795	0.5609756
0.5333333	0.4615385	0.5909091	0.7027027	0.5952381
0.4761905	0.5000000	0.5681818	0.6279070	0.5263158
0.4324324	0.4358974	0.6250000	0.4473684	0.6521739
0.6170213	0.6170213	0.6521739	0.6739130	0.6304348
0.5319149	0.5471698	0.5869565	0.6000000	0.6136364
0.6222222	0.5777778	0.7045455	0.6470588	0.6222222
0.5800000	0.6170213	0.5714286	0.5434783	0.6326531
0.5333333	0.5333333	0.4693878	0.4772727	0.4500000
0.4324324	0.3947368	1.0000000		
0.4680851	0.5681818	0.5217391	0.5531915	0.5652174
0.5581395	0.5636364	0.5925926	0.5818182	0.6037736
0.6153846	0.4761905	0.5800000	0.5750000	0.5416667
0.5111111	0.4893617	0.5000000	0.5106383	0.5102041
0.8292683	0.7333333	0.6888889	0.7142857	0.5319149
0.5652174	0.5625000	0.5319149	0.5652174	0.6097561
0.5416667	0.5319149	0.5111111	0.5750000	0.5102041
0.5652174	0.5333333	0.5102041	0.5000000	0.5000000
0.5434783	0.5128205	0.5652174	0.5853659	0.5000000
0.4883721	0.5333333	0.5434783	0.5652174	0.5384615
0.4358974	0.4500000	0.5581395	0.4615385	0.6250000
0.5918367	0.5918367	0.6250000	0.6458333	0.6041667
0.5000000	0.5454545	0.6170213	0.6304348	0.6444444
0.6521739	0.5208333	0.6595745	0.5263158	0.6170213
0.5769231	0.6122449	0.5686275	0.5416667	0.6600000
0.5106383	0.4791667	0.4509804	0.4782609	0.4186047
0.4473684	0.4473684	0.7631579	1.0000000	
0.5116279	0.5476190	0.5000000	0.5454545	0.5581395
0.5000000	0.5384615	0.5686275	0.5576923	0.5800000
0.5918367	0.4871795	0.5531915	0.5945946	0.5000000
0.5609756	0.4130435	0.4888889	0.5227273	0.5000000
0.7250000	0.7142857	0.6666667	0.7368421	0.5454545
0.5581395	0.5555556	0.5454545	0.5581395	0.5641026
0.5333333	0.5227273	0.4883721	0.5128205	0.5217391
0.5581395	0.5476190	0.5217391	0.5135135	0.5121951
0.5227273	0.4864865	0.5813953	0.6486486	0.5116279
0.5000000	0.5238095	0.5581395	0.5581395	0.5555556
0.4857143	0.5000000	0.5750000	0.4722222	0.6222222
0.5869565	0.5869565	0.6222222	0.6444444	0.6000000
0.4893617	0.5192308	0.5909091	0.6046512	0.6190476
0.6279070	0.5111111	0.6363636	0.5882353	0.5909091
0.5510204	0.5869565	0.5416667	0.5111111	0.6382979
0.5000000	0.4666667	0.4375000	0.4651163	0.4102564
0.4571429	0.4571429	0.8000000	0.8823529	1.0000000
0.4782609	0.5454545	0.5000000	0.5319149	0.5434783
0.5348837	0.5454545	0.5740741	0.5636364	0.5849057
0.5961538	0.4878049	0.5600000	0.5897436	0.5208333



0.5227273	0.4680851	0.4791667	0.4893617	0.4897959
0.8048780	0.7111111	0.6666667	0.7317073	0.5106383
0.5434783	0.5416667	0.5106383	0.5434783	0.5853659
0.5208333	0.5106383	0.4888889	0.5500000	0.4897959
0.5434783	0.5111111	0.4897959	0.5128205	0.4772727
0.5217391	0.4871795	0.5434783	0.6000000	0.4782609
0.5000000	0.5454545	0.5217391	0.5434783	0.5526316
0.4473684	0.4615385	0.5348837	0.4358974	0.6041667
0.5714286	0.5714286	0.6041667	0.6250000	0.5833333
0.4800000	0.5272727	0.5957447	0.6086957	0.6222222
0.6304348	0.5000000	0.6382979	0.5405405	0.5957447
0.5576923	0.5918367	0.5490196	0.5208333	0.6400000
0.4893617	0.4583333	0.4313725	0.4888889	0.4285714
0.4210526	0.4210526	0.7837838	0.9714286	0.9090909
1.0000000				
0.5116279	0.5476190	0.5000000	0.5454545	0.5581395
0.5000000	0.5384615	0.5686275	0.5576923	0.5800000
0.5918367	0.4871795	0.5531915	0.5945946	0.5000000
0.5609756	0.4130435	0.4888889	0.5227273	0.5000000
0.7250000	0.7142857	0.6666667	0.7368421	0.5454545
0.5581395	0.5555556	0.5454545	0.5581395	0.5641026
0.5333333	0.5227273	0.4883721	0.5128205	0.5217391
0.5581395	0.5476190	0.5217391	0.5135135	0.5121951
0.5227273	0.4864865	0.5813953	0.6486486	0.5116279
0.5000000	0.5238095	0.5581395	0.5581395	0.5555556
0.4857143	0.5000000	0.5750000	0.4722222	0.6222222
0.5869565	0.5869565	0.6222222	0.6444444	0.6000000
0.4893617	0.5192308	0.5909091	0.6046512	0.6190476
0.6279070	0.5111111	0.6363636	0.5882353	0.5909091
0.5510204	0.5869565	0.5416667	0.5111111	0.6382979
0.5000000	0.4666667	0.4375000	0.4651163	0.4102564
0.4571429	0.4571429	0.8000000	0.8823529	1.0000000
0.9090909	1.0000000			
0.4888889	0.5581395	0.5111111	0.5777778	0.5909091
0.5116279	0.5555556	0.5849057	0.5740741	0.5961538
0.6078431	0.4634146	0.5714286	0.5641026	0.5000000
0.5348837	0.4166667	0.5217391	0.5333333	0.5000000
0.7380952	0.7272727	0.6818182	0.7073171	0.5555556
0.5909091	0.5869565	0.5555556	0.5909091	0.5609756
0.5652174	0.5555556	0.5000000	0.5250000	0.5319149
0.5909091	0.5581395	0.5319149	0.4871795	0.5238095
0.5333333	0.5000000	0.5909091	0.6153846	0.5227273
0.4761905	0.4888889	0.5681818	0.5909091	0.5263158
0.4594595	0.4736842	0.5853659	0.4864865	0.6521739
0.6170213	0.6170213	0.6521739	0.6739130	0.6304348
0.4897959	0.5370370	0.6086957	0.6222222	0.6363636
0.6444444	0.5434783	0.6521739	0.5555556	0.6086957
0.5686275	0.6041667	0.5600000	0.5319149	0.6530612
0.5333333	0.5000000	0.4693878	0.4347826	0.4047619

0.4722222	0.4722222	0.7837838	0.8888889	0.9687500
0.8611111	0.9687500	1.0000000		
0.5000000	0.5714286	0.5227273	0.5681818	0.5813953
0.5238095	0.5471698	0.5769231	0.5660377	0.5882353
0.6000000	0.4750000	0.5625000	0.5789474	0.5106383
0.5476190	0.4255319	0.5111111	0.5454545	0.5106383
0.7317073	0.7209302	0.6744186	0.7000000	0.5681818
0.5813953	0.5777778	0.5681818	0.5813953	0.5750000
0.5555556	0.5454545	0.5116279	0.5384615	0.5434783
0.5813953	0.5714286	0.5434783	0.5000000	0.5365854
0.5454545	0.5135135	0.6046512	0.6315789	0.5348837
0.4878049	0.5000000	0.5813953	0.5813953	0.5405405
0.4722222	0.4864865	0.6000000	0.5000000	0.6444444
0.6086957	0.6086957	0.6444444	0.6666667	0.6222222
0.5000000	0.5283019	0.6000000	0.6136364	0.6279070
0.6363636	0.5333333	0.6444444	0.5714286	0.6000000
0.5600000	0.5957447	0.5510204	0.5217391	0.6458333
0.5227273	0.4888889	0.4583333	0.4444444	0.3902439
0.4857143	0.4857143	0.7777778	0.8857143	0.9687500
0.8571429	0.9687500	1.0000000	1.0000000	
0.5416667	0.6086957	0.5957447	0.5918367	0.5714286
0.5652174	0.7500000	0.7169811	0.7358491	0.7647059
0.7800000	0.4255319	0.7142857	0.5111111	0.6122449
0.5531915	0.4705882	0.5714286	0.5833333	0.6458333
0.7021277	0.8043478	0.7608696	0.8333333	0.6041667
0.6041667	0.6326531	0.5714286	0.5714286	0.6136364
0.5800000	0.5714286	0.5531915	0.5111111	0.5490196
0.5714286	0.5744681	0.5800000	0.4444444	0.5434783
0.5833333	0.4222222	0.6041667	0.6279070	0.5744681
0.4375000	0.5102041	0.6170213	0.7111111	0.4772727
0.3555556	0.3695652	0.6363636	0.4761905	0.6274510
0.6274510	0.6274510	0.6274510	0.6470588	0.6400000
0.6326531	0.7307692	0.7608696	0.7391304	0.7555556
0.7608696	0.5918367	0.9302326	0.4651163	0.7608696
0.7400000	0.7142857	0.7346939	0.7173913	0.7600000
0.6521739	0.6170213	0.6808511	0.4600000	0.4666667
0.3953488	0.3953488	0.6744186	0.6304348	0.6046512
0.6086957	0.6046512	0.6222222	0.6136364	1.0000000
0.5000000	0.5625000	0.5200000	0.5490196	0.5600000
0.4897959	0.7037037	0.7037037	0.7222222	0.7500000
0.7647059	0.4166667	0.7000000	0.5333333	0.5686275
0.5416667	0.4615385	0.5294118	0.5400000	0.6000000
0.7608696	0.8666667	0.8222222	0.8571429	0.5600000
0.5600000	0.5882353	0.5294118	0.5600000	0.6000000
0.5384615	0.5294118	0.5102041	0.4680851	0.5094340
0.5600000	0.5306122	0.5384615	0.4347826	0.5319149
0.5400000	0.4130435	0.5294118	0.6136364	0.5306122
0.4285714	0.5000000	0.5714286	0.6595745	0.4347826
0.3478261	0.3913043	0.6222222	0.4318182	0.6470588
0.6153846	0.6153846	0.6800000	0.6666667	0.6274510

0.6200000	0.6851852	0.7083333	0.7234043	0.7391304
0.7446809	0.5800000	0.9090909	0.5238095	0.7446809
0.7600000	0.8085106	0.7551020	0.7021277	0.7450980
0.6382979	0.6041667	0.6326531	0.4509804	0.4255319
0.3863636	0.3863636	0.7804878	0.7272727	0.7073171
0.7045455	0.7073171	0.7209302	0.7142857	0.8837209
1.0000000				
0.5102041	0.5744681	0.5306122	0.5600000	0.5714286
0.5000000	0.7169811	0.7169811	0.7358491	0.7647059
0.7800000	0.4255319	0.6800000	0.5111111	0.5800000
0.5208333	0.4705882	0.5400000	0.5510204	0.6458333
0.7391304	0.8863636	0.8409091	0.8333333	0.5714286
0.5714286	0.6000000	0.5400000	0.5714286	0.6136364
0.5490196	0.5400000	0.5208333	0.4782609	0.5192308
0.5714286	0.5416667	0.5490196	0.4444444	0.5434783
0.5510204	0.4222222	0.5098039	0.6279070	0.5416667
0.4375000	0.5102041	0.5833333	0.6739130	0.4130435
0.3555556	0.4000000	0.6000000	0.4418605	0.6274510
0.5961538	0.5961538	0.6274510	0.6153846	0.6078431
0.6326531	0.6981132	0.6875000	0.7021277	0.7173913
0.7234043	0.5918367	0.9302326	0.4651163	0.7234043
0.7400000	0.7872340	0.7346939	0.7173913	0.7254902
0.6521739	0.6170213	0.6458333	0.4313725	0.4042553
0.3636364	0.3636364	0.7142857	0.6666667	0.6428571
0.6444444	0.6428571	0.6590909	0.6511628	0.8604651
0.9285714	1.0000000			
0.4583333	0.5217391	0.4791667	0.5102041	0.5208333
0.4782609	0.6730769	0.7058824	0.6923077	0.7200000
0.7346939	0.4000000	0.6326531	0.5238095	0.5957447
0.5000000	0.4200000	0.4897959	0.5000000	0.5957447
0.6888889	0.8372093	0.7906977	0.7804878	0.4897959
0.5208333	0.5200000	0.4897959	0.5208333	0.5581395
0.5000000	0.4897959	0.4375000	0.4883721	0.4705882
0.5208333	0.4893617	0.4705882	0.4186047	0.4888889
0.4693878	0.4634146	0.5531915	0.5348837	0.4893617
0.4130435	0.4583333	0.5319149	0.5869565	0.4523810
0.3571429	0.4047619	0.5454545	0.3809524	0.5800000
0.5490196	0.5490196	0.5800000	0.6000000	0.5600000
0.5510204	0.6538462	0.6041667	0.6170213	0.6304348
0.6382979	0.4800000	0.8372093	0.4390244	0.6382979
0.6600000	0.7021277	0.6530612	0.6666667	0.6800000
0.6000000	0.5652174	0.5625000	0.4081633	0.3777778
0.4000000	0.4000000	0.7000000	0.7317073	0.7105263
0.7073171	0.7105263	0.7250000	0.7179487	0.7674419
0.8333333	0.8536585	1.0000000		
0.5555556	0.6279070	0.6511628	0.6086957	0.6222222
0.4468085	0.5818182	0.6111111	0.5714286	0.5925926
0.6037736	0.4651163	0.5384615	0.4222222	0.5306122
0.5681818	0.6136364	0.6222222	0.6511628	0.6304348
0.4615385	0.4905660	0.5098039	0.4897959	0.6222222

0.6222222	0.6521739	0.6590909	0.6222222	0.5952381
0.6304348	0.6590909	0.4680851	0.4883721	0.6666667
0.6222222	0.5909091	0.6304348	0.4186047	0.6750000
0.5319149	0.4634146	0.5531915	0.5000000	0.5909091
0.5116279	0.5555556	0.6000000	0.5869565	0.3260870
0.4000000	0.3720930	0.5111111	0.3488372	0.5490196
0.5490196	0.5490196	0.5490196	0.6000000	0.5294118
0.6739130	0.5636364	0.5098039	0.4901961	0.5000000
0.5098039	0.4800000	0.5192308	0.3720930	0.5098039
0.5370370	0.5094340	0.5283019	0.5306122	0.5849057
0.4117647	0.4117647	0.4150943	0.8157895	0.5500000
0.3333333	0.3658537	0.5111111	0.4489796	0.4347826
0.4285714	0.4347826	0.4375000	0.4468085	0.5200000
0.5098039	0.4901961	0.4400000	1.0000000	
0.5000000	0.5476190	0.5348837	0.5000000	0.5111111
0.3617021	0.5185185	0.5185185	0.5370370	0.5576923
0.5686275	0.4047619	0.5306122	0.3636364	0.4893617
0.4883721	0.5000000	0.5454545	0.5227273	0.4893617
0.4200000	0.4800000	0.5000000	0.4468085	0.5111111
0.5454545	0.5434783	0.5111111	0.5111111	0.4651163
0.4893617	0.5813953	0.3829787	0.4285714	0.5217391
0.5454545	0.5348837	0.5555556	0.3902439	0.5500000
0.4468085	0.4358974	0.4375000	0.4523810	0.5116279
0.4523810	0.4666667	0.5227273	0.5454545	0.2954545
0.3947368	0.3750000	0.4545455	0.3500000	0.4800000
0.4800000	0.4800000	0.4800000	0.5306122	0.5102041
0.5000000	0.5283019	0.4693878	0.4791667	0.4893617
0.5000000	0.4680851	0.5416667	0.3414634	0.4693878
0.4716981	0.4423077	0.4339623	0.4893617	0.5800000
0.3673469	0.3673469	0.4583333	0.6000000	0.4250000
0.3333333	0.3333333	0.4000000	0.3469388	0.3260870
0.3265306	0.3260870	0.3333333	0.3404255	0.5106383
0.4693878	0.5106383	0.4255319	0.6341463	1.0000000
0.7250000	0.8157895	0.7500000	0.8250000	0.8461538
0.5952381	0.6226415	0.6226415	0.6111111	0.6346154
0.6470588	0.5500000	0.6458333	0.5365854	0.5416667
0.7435897	0.5909091	0.7560976	0.7948718	0.5744681
0.5957447	0.5918367	0.5833333	0.6000000	0.8000000
0.8461538	0.8292683	0.8461538	0.8461538	0.6923077
0.8500000	0.8000000	0.6585366	0.6578947	0.8048780
0.8461538	0.8157895	0.7619048	0.5789474	0.6500000
0.6511628	0.4750000	0.6000000	0.7567568	0.7692308
0.6000000	0.6428571	0.8205128	0.8000000	0.5000000
0.5277778	0.5263158	0.6750000	0.5405405	0.7333333
0.6956522	0.6956522	0.6595745	0.6808511	0.7111111
0.5957447	0.5740741	0.6888889	0.7045455	0.7209302
0.7272727	0.6976744	0.5918367	0.4146341	0.5833333
0.5185185	0.5192308	0.5094340	0.5102041	0.6600000
0.5106383	0.4791667	0.4800000	0.5111111	0.4878049
0.3095238	0.3095238	0.6585366	0.5909091	0.5853659

0.5681818	0.5853659	0.6190476	0.6097561	0.5957447
0.5833333	0.5957447	0.5434783	0.5777778	0.4666667
1.0000000				
0.5897436	0.6315789	0.7027027	0.6097561	0.6666667
0.6944444	0.5192308	0.4905660	0.4545455	0.4716981
0.4807692	0.5555556	0.6000000	0.6285714	0.7000000
0.6052632	0.5750000	0.6666667	0.6410256	0.7179487
0.4468085	0.4489796	0.4375000	0.4772727	0.6666667
0.6250000	0.7000000	0.6250000	0.6666667	0.6388889
0.5952381	0.6666667	0.6944444	0.6285714	0.6341463
0.6666667	0.6315789	0.6750000	0.5882353	0.5945946
0.6410256	0.5588235	0.5348837	0.6111111	0.5897436
0.6571429	0.6153846	0.6000000	0.5476190	0.4594595
0.4705882	0.4444444	0.6666667	0.5625000	0.6136364
0.5777778	0.5777778	0.6511628	0.5652174	0.5909091
0.7073171	0.4716981	0.6428571	0.5813953	0.5952381
0.6046512	0.6097561	0.5106383	0.3421053	0.4680851
0.4423077	0.4117647	0.4600000	0.4565217	0.4901961
0.4222222	0.4222222	0.4565217	0.4878049	0.4102564
0.3243243	0.3243243	0.4523810	0.4545455	0.4634146
0.4318182	0.4634146	0.4761905	0.4878049	0.5454545
0.5000000	0.5111111	0.4772727	0.4883721	0.4634146
0.5750000	1.0000000			
0.4385965	0.4909091	0.4821429	0.5357143	0.5454545
0.4545455	0.7678571	0.7368421	0.7241379	0.7500000
0.7636364	0.3392857	0.6140351	0.4074074	0.6111111
0.5000000	0.4561404	0.5178571	0.5090909	0.5818182
0.6603774	0.7843137	0.7450980	0.6346154	0.5178571
0.5454545	0.5438596	0.5454545	0.5454545	0.5490196
0.5535714	0.5178571	0.4727273	0.4074074	0.5263158
0.5454545	0.4909091	0.5000000	0.3518519	0.4363636
0.4736842	0.3584906	0.5178571	0.5000000	0.4909091
0.3750000	0.4385965	0.5272727	0.5454545	0.3773585
0.3076923	0.3148148	0.5384615	0.3461538	0.5964912
0.5689655	0.5689655	0.6250000	0.6140351	0.5517241
0.6603774	0.7500000	0.6481481	0.6296296	0.6415094
0.6481481	0.5357143	0.7500000	0.4200000	0.7115385
0.7924528	0.8039216	0.8235294	0.7400000	0.7142857
0.5555556	0.5555556	0.6111111	0.4727273	0.4509804
0.3076923	0.3076923	0.6326531	0.5961538	0.5714286
0.5769231	0.5714286	0.5882353	0.5800000	0.6923077
0.7450980	0.7254902	0.6800000	0.5272727	0.4905660
0.5660377	0.4615385	1.0000000		
0.4655172	0.5178571	0.5087719	0.5614035	0.5438596
0.5090909	0.8214286	0.7586207	0.7758621	0.8035714
0.7857143	0.3928571	0.6666667	0.4363636	0.6071429
0.5000000	0.4576271	0.5172414	0.5263158	0.6071429
0.6545455	0.7735849	0.7358491	0.6923077	0.5714286
0.5714286	0.5964912	0.5438596	0.5438596	0.5471698
0.5517241	0.5438596	0.5000000	0.4107143	0.5254237

0.5438596	0.5178571	0.5517241	0.3818182	0.4642857
0.5263158	0.3888889	0.5172414	0.5283019	0.5178571
0.4035088	0.4912281	0.5535714	0.5714286	0.3818182
0.3090909	0.3214286	0.5660377	0.3773585	0.6206897
0.6206897	0.6206897	0.6206897	0.6101695	0.6034483
0.6250000	0.7719298	0.6727273	0.6545455	0.6666667
0.6727273	0.5614035	0.8076923	0.3962264	0.7358491
0.8490566	0.7924528	0.8113208	0.7307692	0.7068966
0.5818182	0.5818182	0.6363636	0.4482759	0.4259259
0.3396226	0.3396226	0.5660377	0.5636364	0.5384615
0.5454545	0.5384615	0.5555556	0.5471698	0.7500000
0.7358491	0.7500000	0.6730769	0.5000000	0.4909091
0.5357143	0.4629630	0.8679245	1.0000000	
0.4615385	0.5200000	0.5098039	0.5686275	0.5490196
0.5102041	0.7884615	0.7547170	0.7407407	0.7692308
0.7843137	0.4375000	0.6226415	0.4583333	0.5576923
0.4705882	0.4807692	0.5192308	0.5294118	0.6530612
0.6734694	0.8085106	0.7659574	0.7173913	0.5800000
0.5800000	0.6078431	0.5490196	0.5490196	0.5869565
0.5576923	0.5490196	0.5000000	0.4285714	0.5283019
0.5490196	0.5200000	0.5576923	0.3958333	0.5531915
0.5600000	0.4347826	0.5192308	0.5652174	0.5200000
0.4200000	0.4901961	0.5600000	0.6122449	0.3673469
0.3125000	0.3541667	0.5744681	0.3913043	0.5740741
0.5740741	0.5740741	0.5740741	0.5925926	0.5555556
0.6400000	0.7358491	0.6600000	0.6400000	0.6530612
0.6600000	0.5686275	0.8085106	0.4130435	0.7659574
0.8163265	0.8297872	0.8125000	0.7608696	0.7307692
0.6956522	0.6956522	0.6875000	0.5306122	0.4468085
0.3478261	0.3777778	0.5744681	0.5714286	0.5434783
0.5510204	0.5434783	0.5625000	0.5531915	0.7826087
0.7659574	0.8222222	0.6956522	0.5918367	0.5208333
0.5400000	0.4583333	0.7307692	0.7884615	1.0000000
0.3275862	0.3750000	0.3928571	0.4210526	0.4285714
0.3888889	0.6491228	0.6206897	0.6101695	0.6315789
0.6428571	0.2727273	0.5263158	0.3653846	0.5471698
0.4074074	0.3448276	0.4035088	0.3859649	0.5769231
0.5370370	0.6538462	0.6153846	0.5384615	0.4285714
0.4285714	0.4561404	0.4035088	0.4285714	0.4509804
0.4137931	0.4035088	0.4074074	0.3396226	0.3898305
0.4285714	0.3750000	0.4137931	0.2830189	0.3703704
0.4107143	0.2884615	0.4285714	0.4313725	0.3750000
0.3090909	0.3750000	0.4107143	0.4545455	0.3076923
0.2307692	0.2452830	0.4705882	0.3265306	0.5087719
0.4827586	0.4827586	0.5357143	0.5263158	0.4655172
0.5660377	0.6607143	0.5849057	0.5370370	0.5471698
0.5555556	0.4727273	0.6538462	0.3750000	0.7142857
0.7307692	0.7755102	0.7959184	0.7083333	0.6250000
0.6458333	0.6458333	0.7083333	0.4339623	0.4081633
0.2600000	0.3125000	0.4705882	0.4716981	0.4400000

0.4528302	0.4400000	0.4615385	0.4509804	0.6600000
0.6470588	0.6274510	0.5490196	0.4629630	0.4800000
0.4181818	0.3921569	0.7843137	0.7735849	0.7346939
1.0000000				
0.3508772	0.4000000	0.4181818	0.4464286	0.4545455
0.4150943	0.6785714	0.6785714	0.6666667	0.6909091
0.7037037	0.2962963	0.5818182	0.3921569	0.5769231
0.4339623	0.3684211	0.4285714	0.4107143	0.5769231
0.5961538	0.7200000	0.6800000	0.6000000	0.4545455
0.4545455	0.4821429	0.4285714	0.4545455	0.4800000
0.4385965	0.4285714	0.4339623	0.3653846	0.4137931
0.4545455	0.4000000	0.4385965	0.3076923	0.3962264
0.4363636	0.3137255	0.4545455	0.4600000	0.4000000
0.3333333	0.4000000	0.4363636	0.4814815	0.3333333
0.2549020	0.2692308	0.5000000	0.3541667	0.5636364
0.5357143	0.5357143	0.5636364	0.5535714	0.5178571
0.5660377	0.7222222	0.6153846	0.5660377	0.5769231
0.5849057	0.5000000	0.7200000	0.3750000	0.7872340
0.7647059	0.7755102	0.8333333	0.7826087	0.6250000
0.6458333	0.6458333	0.7083333	0.4339623	0.4081633
0.2857143	0.3125000	0.5000000	0.5000000	0.4693878
0.4807692	0.4693878	0.4901961	0.4800000	0.6938776
0.6800000	0.6938776	0.6122449	0.4629630	0.5102041
0.4444444	0.4200000	0.8200000	0.8431373	0.7708333
0.9111111	1.0000000			
0.5686275	0.6326531	0.5882353	0.6470588	0.6274510
0.5294118	0.8301887	0.8653846	0.8846154	0.9200000
0.9000000	0.4897959	0.6981132	0.4800000	0.6037736
0.5800000	0.5000000	0.5961538	0.6078431	0.6037736
0.6538462	0.7800000	0.7400000	0.6938776	0.6274510
0.6600000	0.6538462	0.6274510	0.6274510	0.5714286
0.6346154	0.6274510	0.4905660	0.5416667	0.6037736
0.6274510	0.6326531	0.6037736	0.4791667	0.5400000
0.5471698	0.4285714	0.6938776	0.5833333	0.6000000
0.5000000	0.5686275	0.6734694	0.6938776	0.5106383
0.4255319	0.4680851	0.5918367	0.4166667	0.6792453
0.6792453	0.6792453	0.6481481	0.7307692	0.6923077
0.5925926	0.8113208	0.6111111	0.6226415	0.6346154
0.6415094	0.5272727	0.7800000	0.4081633	0.7058824
0.7222222	0.6981132	0.6851852	0.7000000	0.8076923
0.6400000	0.6078431	0.6346154	0.4905660	0.4400000
0.3750000	0.3750000	0.6122449	0.6200000	0.6170213
0.6000000	0.6170213	0.6458333	0.6382979	0.7200000
0.7058824	0.7200000	0.7446809	0.5471698	0.4807692
0.6530612	0.4705882	0.7090909	0.7636364	0.7254902
0.5892857	0.6481481	1.0000000		
0.2800000	0.3333333	0.3541667	0.3600000	0.3958333
0.3191489	0.4727273	0.4464286	0.4642857	0.4814815
0.4629630	0.2666667	0.3214286	0.2608696	0.4081633
0.2857143	0.3000000	0.3400000	0.3265306	0.4680851

0.3725490	0.4600000	0.4489796	0.3673469	0.3400000
0.3673469	0.4000000	0.3673469	0.3958333	0.3260870
0.3800000	0.3958333	0.3125000	0.2608696	0.3800000
0.3958333	0.3333333	0.3529412	0.2790698	0.3863636
0.3200000	0.2857143	0.3673469	0.3333333	0.2800000
0.3111111	0.3617021	0.3750000	0.3673469	0.2222222
0.2195122	0.2325581	0.3478261	0.2093023	0.3518519
0.3272727	0.3272727	0.3773585	0.3703704	0.3333333
0.4791667	0.4545455	0.4200000	0.4285714	0.4081633
0.4200000	0.3333333	0.4038462	0.2045455	0.4489796
0.4528302	0.5102041	0.4705882	0.5000000	0.4181818
0.4042553	0.3750000	0.4081633	0.3695652	0.4000000
0.2500000	0.2500000	0.3404255	0.3265306	0.3043478
0.3061224	0.3043478	0.3404255	0.3260870	0.4285714
0.4200000	0.4285714	0.4042553	0.5000000	0.3555556
0.3829787	0.3409091	0.4444444	0.4727273	0.5000000
0.4600000	0.4600000	0.4901961	1.0000000	
0.7250000	0.8157895	0.7948718	0.8250000	0.8000000
0.6750000	0.6226415	0.6226415	0.5818182	0.6037736
0.6153846	0.6315789	0.6458333	0.5365854	0.5744681
0.7435897	0.6666667	0.8000000	0.8205128	0.6086957
0.5000000	0.5000000	0.5510204	0.5652174	0.8461538
0.8947368	0.8750000	0.8461538	0.8000000	0.6500000
0.7619048	0.8461538	0.7000000	0.6578947	0.8048780
0.8461538	0.8157895	0.8974359	0.6216216	0.7368421
0.6904762	0.5526316	0.6000000	0.7567568	0.8157895
0.6842105	0.6829268	0.7750000	0.7142857	0.5000000
0.5555556	0.5263158	0.7179487	0.5405405	0.7333333
0.7333333	0.7333333	0.6595745	0.6808511	0.7111111
0.5957447	0.5740741	0.6888889	0.6666667	0.6444444
0.6888889	0.7380952	0.5600000	0.3809524	0.5200000
0.5185185	0.4629630	0.4814815	0.4800000	0.6274510
0.4489796	0.4791667	0.4230769	0.6190476	0.4523810
0.3750000	0.3414634	0.5454545	0.4893617	0.5000000
0.4680851	0.5000000	0.5111111	0.5227273	0.5625000
0.5200000	0.5306122	0.4489796	0.6136364	0.5714286
0.7500000	0.6578947	0.5090909	0.5357143	0.5400000
0.4181818	0.4444444	0.5882353	0.3265306	1.0000000
0.7209302	0.8048780	0.8292683	0.8139535	0.8333333
0.6744186	0.6545455	0.6545455	0.6428571	0.6666667
0.6481481	0.6750000	0.6800000	0.6190476	0.6122449
0.7380952	0.6666667	0.7906977	0.8095238	0.6808511
0.5384615	0.5370370	0.5576923	0.6041667	0.8780488
0.8333333	0.9047619	0.8333333	0.8333333	0.6904762
0.7954545	0.8333333	0.6976744	0.6585366	0.8372093
0.8333333	0.8048780	0.8809524	0.6250000	0.7317073
0.7674419	0.6000000	0.6041667	0.7500000	0.7619048
0.7250000	0.8048780	0.7674419	0.7500000	0.5116279
0.5250000	0.5365854	0.7142857	0.5500000	0.7659574
0.7659574	0.7659574	0.6938776	0.7500000	0.7446809



0.6326531	0.6363636	0.6875000	0.6666667	0.6458333
0.6875000	0.6956522	0.5961538	0.4000000	0.5882353
0.5535714	0.4736842	0.4912281	0.4905660	0.6603774
0.4901961	0.4901961	0.4905660	0.6222222	0.4666667
0.3636364	0.3636364	0.5531915	0.5306122	0.5434783
0.5102041	0.5434783	0.5531915	0.5652174	0.6000000
0.5576923	0.5686275	0.4901961	0.6521739	0.5777778
0.7441860	0.6585366	0.5172414	0.5964912	0.5769231
0.4561404	0.4821429	0.6538462	0.4000000	0.8292683
1.0000000				
0.6578947	0.7500000	0.6842105	0.7179487	0.7368421
0.5897436	0.5384615	0.5686275	0.5576923	0.5800000
0.5918367	0.6285714	0.5869565	0.5675676	0.5681818
0.6756757	0.5238095	0.6500000	0.7105263	0.5813953
0.5333333	0.5319149	0.5555556	0.5348837	0.7368421
0.7837838	0.7250000	0.7368421	0.7368421	0.6666667
0.7000000	0.7368421	0.5897436	0.7575758	0.7000000
0.7837838	0.7500000	0.7435897	0.6666667	0.6216216
0.6250000	0.5428571	0.6341463	0.7878788	0.7500000
0.6857143	0.6410256	0.7567568	0.7368421	0.5714286
0.5937500	0.6060606	0.6944444	0.5937500	0.6363636
0.6000000	0.6000000	0.5652174	0.6222222	0.6136364
0.5217391	0.5490196	0.5909091	0.6046512	0.6190476
0.6279070	0.6341463	0.5319149	0.4054054	0.5555556
0.4339623	0.4313725	0.4230769	0.4468085	0.6041667
0.4772727	0.4772727	0.4782609	0.5121951	0.4000000
0.3513514	0.3157895	0.5897436	0.5853659	0.6052632
0.5609756	0.6052632	0.6153846	0.6315789	0.5333333
0.5217391	0.5333333	0.5348837	0.5116279	0.5000000
0.7777778	0.5945946	0.4807692	0.4814815	0.4791667
0.3846154	0.4117647	0.6170213	0.3043478	0.7297297
0.7692308	1.0000000			
0.8000000	0.8947368	0.8717949	0.9000000	0.8750000
0.6666667	0.7115385	0.7115385	0.6666667	0.6923077
0.7058824	0.5853659	0.7083333	0.5714286	0.6041667
0.8205128	0.7380952	0.8750000	0.8974359	0.6739130
0.5918367	0.5882353	0.6122449	0.6304348	0.8292683
0.9230769	0.9024390	0.8750000	0.8750000	0.7692308
0.8333333	0.8750000	0.6904762	0.6923077	0.8333333
0.8750000	0.8461538	0.8333333	0.5750000	0.7692308
0.6818182	0.5500000	0.6666667	0.7000000	0.8461538
0.6341463	0.6744186	0.8048780	0.8292683	0.5000000
0.5128205	0.5250000	0.6666667	0.5000000	0.7608696
0.7608696	0.7608696	0.7021277	0.7608696	0.7391304
0.6739130	0.6603774	0.7173913	0.6956522	0.6739130
0.7173913	0.7272727	0.6200000	0.4285714	0.5800000
0.5849057	0.5283019	0.5471698	0.5400000	0.7346939
0.4800000	0.4800000	0.4528302	0.6666667	0.5750000
0.3809524	0.3809524	0.6279070	0.5652174	0.5581395
0.5434783	0.5581395	0.5909091	0.5813953	0.6250000

0.5918367	0.5918367	0.5416667	0.6976744	0.5333333
0.8250000	0.6500000	0.5740741	0.5892857	0.6000000
0.4545455	0.4727273	0.6800000	0.3877551	0.8250000
0.8139535	0.7179487	1.0000000		
0.6739130	0.7500000	0.7727273	0.8000000	0.8181818
0.6666667	0.6785714	0.7090909	0.6666667	0.6909091
0.7037037	0.6279070	0.7058824	0.5777778	0.6078431
0.6888889	0.6250000	0.7777778	0.7555556	0.7083333
0.5660377	0.5925926	0.5849057	0.6326531	0.8181818
0.8181818	0.8863636	0.7777778	0.8181818	0.6444444
0.7826087	0.8181818	0.6521739	0.6136364	0.7826087
0.8181818	0.7500000	0.8222222	0.5813953	0.6818182
0.7173913	0.5581395	0.6000000	0.6976744	0.7111111
0.6744186	0.7111111	0.7555556	0.7777778	0.4782609
0.4883721	0.5348837	0.7045455	0.5116279	0.7551020
0.7551020	0.7551020	0.7200000	0.7755102	0.7346939
0.6274510	0.6909091	0.7142857	0.6938776	0.6734694
0.7142857	0.6875000	0.6538462	0.3750000	0.6153846
0.5789474	0.5535714	0.5438596	0.5471698	0.7169811
0.5192308	0.5192308	0.5471698	0.5833333	0.4680851
0.3404255	0.3404255	0.5510204	0.5294118	0.5208333
0.5098039	0.5208333	0.5510204	0.5416667	0.6600000
0.6153846	0.6274510	0.5490196	0.6122449	0.5744681
0.7333333	0.6511628	0.5689655	0.6206897	0.6346154
0.5357143	0.5357143	0.6792453	0.4600000	0.7727273
0.8863636	0.7142857	0.8000000	1.0000000	
0.6341463	0.7179487	0.7000000	0.7317073	0.7500000
0.6666667	0.6153846	0.6153846	0.5740741	0.5961538
0.6078431	0.5789474	0.5400000	0.6052632	0.5319149
0.6923077	0.5813953	0.6666667	0.7250000	0.6363636
0.5869565	0.6170213	0.6818182	0.6279070	0.7073171
0.7948718	0.7380952	0.7500000	0.7500000	0.7297297
0.6744186	0.7500000	0.6923077	0.6486486	0.7142857
0.7948718	0.7179487	0.7560976	0.6111111	0.7297297
0.6829268	0.6285714	0.5909091	0.8000000	0.7179487
0.6315789	0.6341463	0.7250000	0.7073171	0.5263158
0.5428571	0.6000000	0.8055556	0.5714286	0.6521739
0.6170213	0.6170213	0.6521739	0.6739130	0.5957447
0.6222222	0.5660377	0.7209302	0.6976744	0.6744186
0.7209302	0.7317073	0.5833333	0.5135135	0.5744681
0.5384615	0.5400000	0.5294118	0.5319149	0.6530612
0.5333333	0.5681818	0.4693878	0.5348837	0.4047619
0.3947368	0.3589744	0.6923077	0.6190476	0.6410256
0.5952381	0.6410256	0.6500000	0.6666667	0.5869565
0.6444444	0.6222222	0.5681818	0.5681818	0.4545455
0.7000000	0.6052632	0.5576923	0.5272727	0.5957447
0.4615385	0.4615385	0.5800000	0.4000000	0.7435897
0.7380952	0.7222222	0.7500000	0.7272727	1.0000000
0.6341463	0.7179487	0.7000000	0.7317073	0.7500000
0.6250000	0.6153846	0.6153846	0.5740741	0.5961538

0.6078431	0.5384615	0.5714286	0.6052632	0.5652174
0.7368421	0.5813953	0.6666667	0.7250000	0.7142857
0.5869565	0.5833333	0.6444444	0.5555556	0.7073171
0.7948718	0.7380952	0.7500000	0.7500000	0.7777778
0.6744186	0.7500000	0.6923077	0.6486486	0.7142857
0.7948718	0.7179487	0.7560976	0.6111111	0.6842105
0.6829268	0.6285714	0.5909091	0.8000000	0.7179487
0.6315789	0.6341463	0.6829268	0.6666667	0.5263158
0.5882353	0.5555556	0.7567568	0.6176471	0.6888889
0.6521739	0.6521739	0.6521739	0.6739130	0.6304348
0.6222222	0.5660377	0.6818182	0.6590909	0.6363636
0.6818182	0.7750000	0.5510204	0.4736842	0.5744681
0.5094340	0.5098039	0.5000000	0.5319149	0.6200000
0.5000000	0.5333333	0.4693878	0.5348837	0.4047619
0.3947368	0.3589744	0.6097561	0.5454545	0.5609756
0.5227273	0.5609756	0.5714286	0.5853659	0.5531915
0.5416667	0.5531915	0.5000000	0.5681818	0.4883721
0.7000000	0.6052632	0.5283019	0.5272727	0.5625000
0.4901961	0.4901961	0.5800000	0.4000000	0.7435897
0.7380952	0.7222222	0.7750000	0.7272727	0.8333333
1.0000000	0.6000000	0.6842105	0.6250000	0.6585366
0.6750000	0.6153846	0.5283019	0.5283019	0.5185185
0.5384615	0.5490196	0.5675676	0.5416667	0.5945946
0.5555556	0.6153846	0.4772727	0.5952381	0.6500000
0.6046512	0.5555556	0.5531915	0.5777778	0.5952381
0.7179487	0.7179487	0.7073171	0.6750000	0.6750000
0.6944444	0.6428571	0.6750000	0.6578947	0.6388889
0.6428571	0.7179487	0.6842105	0.7250000	0.6470588
0.6052632	0.6923077	0.5714286	0.5454545	0.8750000
0.6842105	0.6216216	0.6250000	0.6923077	0.6750000
0.5135135	0.5294118	0.5000000	0.7714286	0.6250000
0.6222222	0.5869565	0.5869565	0.6222222	0.6086957
0.6000000	0.6136364	0.4814815	0.6511628	0.6666667
0.6829268	0.6904762	0.7000000	0.5869565	0.4722222
0.5777778	0.5098039	0.5102041	0.5000000	0.4680851
0.5918367	0.5348837	0.5348837	0.5000000	0.4651163
0.4250000	0.3421053	0.3076923	0.6578947	0.6097561
0.6315789	0.5853659	0.6315789	0.6410256	0.6578947
0.5909091	0.6136364	0.5909091	0.5581395	0.5000000
0.4186047	0.7105263	0.5789474	0.5000000	0.5000000
0.5319149	0.4313725	0.4313725	0.5714286	0.3260870
0.7105263	0.7073171	0.7428571	0.6750000	0.6590909
0.8000000	0.7500000	1.0000000		
0.7804878	0.8717949	0.8974359	0.8780488	0.9000000
0.6904762	0.6666667	0.6666667	0.6250000	0.6481481
0.6603774	0.6500000	0.6938776	0.5952381	0.5918367
0.8000000	0.7209302	0.8536585	0.8974359	0.6595745
0.5490196	0.5471698	0.5686275	0.5833333	0.9000000
0.9000000	0.9268293	0.9487179	0.9000000	0.7073171
0.9024390	0.9000000	0.7142857	0.6750000	0.9500000

0.9000000	0.8717949	0.9024390	0.6000000	0.7500000
0.7441860	0.6153846	0.6521739	0.7250000	0.8250000
0.7000000	0.7380952	0.8292683	0.7674419	0.5238095
0.5526316	0.5500000	0.6904762	0.5250000	0.7826087
0.7826087	0.7826087	0.7083333	0.7659574	0.7608696
0.6808511	0.6181818	0.7021277	0.6808511	0.6595745
0.7021277	0.7111111	0.5769231	0.4090909	0.5384615
0.5357143	0.4821429	0.5000000	0.5000000	0.6730769
0.4705882	0.4705882	0.4444444	0.6363636	0.5116279
0.3720930	0.3720930	0.6000000	0.5416667	0.5555556
0.5208333	0.5555556	0.5652174	0.5777778	0.5800000
0.5384615	0.5490196	0.5000000	0.7045455	0.5555556
0.8500000	0.6750000	0.5535714	0.5517241	0.5576923
0.4137931	0.4385965	0.6346154	0.4081633	0.8500000
0.8809524	0.7435897	0.8780488	0.8222222	0.7560976
0.7560976	0.6829268	1.0000000		
0.7000000	0.7894737	0.7692308	0.8000000	0.8205128
0.6750000	0.6037736	0.6346154	0.5925926	0.6153846
0.6274510	0.6756757	0.6250000	0.6153846	0.5744681
0.7631579	0.6046512	0.7317073	0.7948718	0.6590909
0.5416667	0.5400000	0.5957447	0.5777778	0.8205128
0.8684211	0.8500000	0.8205128	0.8205128	0.7105263
0.7380952	0.8205128	0.7179487	0.7500000	0.7804878
0.8684211	0.7894737	0.8717949	0.7142857	0.7105263
0.7073171	0.5945946	0.6363636	0.8285714	0.7894737
0.7777778	0.7692308	0.7500000	0.7317073	0.5789474
0.6000000	0.6111111	0.7837838	0.6000000	0.7500000
0.7111111	0.7111111	0.6739130	0.6956522	0.6888889
0.6304348	0.5849057	0.7045455	0.6818182	0.6590909
0.7045455	0.7560976	0.5714286	0.4250000	0.5625000
0.5000000	0.4716981	0.4905660	0.4897959	0.6400000
0.5217391	0.5555556	0.4897959	0.5581395	0.4186047
0.3750000	0.3414634	0.5952381	0.5555556	0.5714286
0.5333333	0.5714286	0.5813953	0.5952381	0.5744681
0.5625000	0.5744681	0.5106383	0.5909091	0.5116279
0.7692308	0.6410256	0.4909091	0.5178571	0.5510204
0.4259259	0.4528302	0.6200000	0.3541667	0.8648649
0.8500000	0.8055556	0.8000000	0.7906977	0.8108108
0.8108108	0.8333333	0.8250000	1.0000000	
0.5897436	0.6315789	0.5750000	0.6097561	0.6250000
0.6216216	0.5192308	0.5192308	0.5094340	0.5294118
0.5400000	0.5714286	0.5319149	0.6470588	0.5581395
0.6052632	0.4318182	0.5476190	0.6000000	0.5952381
0.5813953	0.5777778	0.6046512	0.6250000	0.6666667
0.6666667	0.6585366	0.6250000	0.6250000	0.6857143
0.5952381	0.6250000	0.6486486	0.6470588	0.5952381
0.6666667	0.6756757	0.6750000	0.6562500	0.5526316
0.6842105	0.6250000	0.5853659	0.8125000	0.6315789
0.6285714	0.5897436	0.6410256	0.6250000	0.5588235
0.5312500	0.5000000	0.8181818	0.6666667	0.6136364

0.5777778	0.5777778	0.5777778	0.5652174	0.6279070
0.5111111	0.4716981	0.6428571	0.6585366	0.6750000
0.6829268	0.6500000	0.6136364	0.5000000	0.5681818
0.5000000	0.5000000	0.4897959	0.4565217	0.5510204
0.4883721	0.4883721	0.4565217	0.4523810	0.3500000
0.4117647	0.3714286	0.6486486	0.6153846	0.6388889
0.5897436	0.6388889	0.6486486	0.6666667	0.6190476
0.6046512	0.5813953	0.6000000	0.4545455	0.4285714
0.6578947	0.6000000	0.4901961	0.5192308	0.5217391
0.4200000	0.4489796	0.5416667	0.2888889	0.6578947
0.6585366	0.7272727	0.6097561	0.6136364	0.6944444
0.6944444	0.8125000	0.6341463	0.7222222	1.0000000
0.5365854	0.5750000	0.6000000	0.5581395	0.5714286
0.4878049	0.5384615	0.5384615	0.5000000	0.5192308
0.5294118	0.4000000	0.5208333	0.5000000	0.5454545
0.5500000	0.5609756	0.6097561	0.5853659	0.6190476
0.4680851	0.4693878	0.4893617	0.5000000	0.5714286
0.5714286	0.6046512	0.5714286	0.5714286	0.6666667
0.5454545	0.5714286	0.5121951	0.4615385	0.5813953
0.5714286	0.5750000	0.5813953	0.3846154	0.6216216
0.5853659	0.5142857	0.5000000	0.5128205	0.5365854
0.4500000	0.5365854	0.5116279	0.5348837	0.3170732
0.3888889	0.3333333	0.5250000	0.3783784	0.5319149
0.5319149	0.5319149	0.5000000	0.5531915	0.5434783
0.5681818	0.4905660	0.5217391	0.5000000	0.4782609
0.5217391	0.5227273	0.5000000	0.3684211	0.5217391
0.4901961	0.4600000	0.4800000	0.4782609	0.5098039
0.4130435	0.4130435	0.3877551	0.7714286	0.5277778
0.3611111	0.4000000	0.4523810	0.4222222	0.4047619
0.4000000	0.4047619	0.4090909	0.4186047	0.5000000
0.4583333	0.4680851	0.4130435	0.7567568	0.6486486
0.4883721	0.5405405	0.4807692	0.4814815	0.5777778
0.4693878	0.5000000	0.4705882	0.4047619	0.6000000
0.6046512	0.4500000	0.6341463	0.5652174	0.5500000
0.6315789	0.4750000	0.6190476	0.5365854	0.5000000
1.0000000				
0.4782609	0.5454545	0.5681818	0.5652174	0.5777778
0.4042553	0.5454545	0.5740741	0.5357143	0.5555556
0.5660377	0.3863636	0.5294118	0.3777778	0.5208333
0.4888889	0.5333333	0.6136364	0.5681818	0.5869565
0.4509804	0.4807692	0.5306122	0.4791667	0.5434783
0.6136364	0.6086957	0.5777778	0.5777778	0.5476190
0.5869565	0.6136364	0.4255319	0.4418605	0.5869565
0.6136364	0.5111111	0.5869565	0.3720930	0.5853659
0.4893617	0.4146341	0.5106383	0.4883721	0.5454545
0.4318182	0.4782609	0.4893617	0.5434783	0.3111111
0.3170732	0.2954545	0.4666667	0.3023256	0.5098039
0.5098039	0.5098039	0.5098039	0.5600000	0.4901961
0.6086957	0.5272727	0.5000000	0.4800000	0.4600000
0.5000000	0.5000000	0.5098039	0.3255814	0.5000000

0.5283019	0.5000000	0.5192308	0.4897959	0.5769231
0.4285714	0.4583333	0.4038462	0.7631579	0.5789474
0.2857143	0.2857143	0.5348837	0.4375000	0.4000000
0.4166667	0.4000000	0.4255319	0.4130435	0.4800000
0.4705882	0.4800000	0.4285714	0.7948718	0.6250000
0.5333333	0.4761905	0.5471698	0.4912281	0.5833333
0.4807692	0.4807692	0.5094340	0.4222222	0.6046512
0.5744681	0.5000000	0.6511628	0.5714286	0.5581395
0.5581395	0.4883721	0.6222222	0.5454545	0.4418605
0.7500000	1.0000000			
0.6086957	0.6444444	0.7045455	0.6250000	0.6739130
0.6000000	0.6545455	0.6250000	0.6140351	0.6071429
0.6181818	0.4565217	0.5849057	0.5454545	0.7555556
0.6222222	0.5957447	0.7111111	0.6888889	0.8372093
0.5384615	0.5660377	0.5576923	0.5098039	0.6739130
0.6382979	0.7021277	0.6382979	0.6739130	0.6511628
0.6458333	0.6382979	0.6590909	0.5454545	0.6808511
0.6739130	0.6086957	0.7173913	0.4772727	0.5777778
0.6170213	0.4545455	0.5400000	0.6279070	0.6086957
0.5333333	0.5744681	0.6170213	0.6382979	0.4130435
0.3863636	0.3695652	0.6000000	0.4761905	0.6274510
0.5961538	0.5961538	0.6274510	0.5849057	0.5769231
0.8181818	0.6363636	0.6875000	0.6326531	0.6122449
0.6530612	0.6595745	0.5961538	0.3404255	0.5882353
0.5818182	0.5849057	0.6037736	0.5490196	0.6000000
0.4901961	0.4901961	0.5192308	0.5531915	0.4666667
0.2765957	0.2765957	0.4897959	0.4423077	0.4489796
0.4230769	0.4489796	0.4600000	0.4693878	0.6000000
0.5576923	0.6000000	0.4901961	0.5510204	0.5106383
0.5957447	0.7435897	0.6000000	0.5964912	0.6078431
0.5660377	0.5660377	0.5636364	0.4285714	0.6666667
0.6666667	0.5333333	0.6956522	0.6938776	0.6222222
0.6976744	0.5909091	0.6808511	0.6444444	0.5454545
0.6046512	0.5744681	1.0000000		
0.5833333	0.6170213	0.6739130	0.6000000	0.6458333
0.5744681	0.6909091	0.6315789	0.6491228	0.6428571
0.6250000	0.4375000	0.5925926	0.5217391	0.7608696
0.5957447	0.6041667	0.6808511	0.6595745	0.8409091
0.5471698	0.5740741	0.5660377	0.5192308	0.6458333
0.6122449	0.6734694	0.6122449	0.6458333	0.6590909
0.6200000	0.6122449	0.6304348	0.5217391	0.6530612
0.6458333	0.5833333	0.6875000	0.4565217	0.5531915
0.5918367	0.4347826	0.5192308	0.6000000	0.5833333
0.5106383	0.6170213	0.5918367	0.6122449	0.3958333
0.3695652	0.3541667	0.5744681	0.4545455	0.6037736
0.5740741	0.5740741	0.6037736	0.5636364	0.5555556
0.8222222	0.6428571	0.6938776	0.6400000	0.6200000
0.6600000	0.6326531	0.6037736	0.3265306	0.5961538
0.6181818	0.5925926	0.6111111	0.5576923	0.6071429

0.4716981	0.4716981	0.5000000	0.5625000	0.4782609
0.2653061	0.2653061	0.4800000	0.4528302	
0.4400000	0.4339623	0.4400000	0.4423077	0.4509804
0.6078431	0.5660377	0.6078431	0.5000000	0.5600000
0.5208333	0.5714286	0.7073171	0.6071429	0.6315789
0.6153846	0.5740741	0.5740741	0.5714286	0.4400000
0.6382979	0.6734694	0.5106383	0.6666667	0.6666667
0.5957447	0.6666667	0.5652174	0.6530612	0.6170213
0.5217391	0.6136364	0.5833333	0.9523810	1.0000000
0.5416667	0.6086957	0.6666667	0.5918367	0.6382979
0.5652174	0.6851852	0.6250000	0.6428571	0.6666667
0.6481481	0.4565217	0.5849057	0.5454545	0.7555556
0.5869565	0.5957447	0.6382979	0.6304348	0.8372093
0.5686275	0.5961538	0.5882353	0.5400000	0.6382979
0.6041667	0.6666667	0.6382979	0.6382979	0.6904762
0.6122449	0.6041667	0.6222222	0.5454545	0.6458333
0.6382979	0.5744681	0.6458333	0.4772727	0.5777778
0.6170213	0.4545455	0.5714286	0.6279070	0.5744681
0.5333333	0.6444444	0.5510204	0.6041667	0.4130435
0.3953488	0.3695652	0.6000000	0.4761905	0.5961538
0.5660377	0.5660377	0.5961538	0.5849057	0.5471698
0.8604651	0.6363636	0.6875000	0.6326531	0.6122449
0.6530612	0.6250000	0.6274510	0.3404255	0.6200000
0.5818182	0.5555556	0.6037736	0.5800000	0.6296296
0.4901961	0.4901961	0.5192308	0.5869565	0.4666667
0.2765957	0.2765957	0.5319149	0.4705882	0.4583333
0.4509804	0.4583333	0.4600000	0.4693878	0.6326531
0.5882353	0.6326531	0.5200000	0.6170213	0.5434783
0.5957447	0.7000000	0.6296296	0.6250000	0.6400000
0.5660377	0.5961538	0.5925926	0.4583333	0.6304348
0.7021277	0.5333333	0.6595745	0.6600000	0.6222222
0.6590909	0.5909091	0.6808511	0.6444444	0.5454545
0.6428571	0.6444444	0.8604651	0.9069767	1.0000000
0.6346154	0.6666667	0.6538462	0.6792453	0.6603774
0.5660377	0.8545455	0.8545455	0.8727273	0.8703704
0.8518519	0.4716981	0.6964286	0.4629630	0.6071429
0.6470588	0.5925926	0.6603774	0.7058824	0.6363636
0.6545455	0.7090909	0.7037037	0.6296296	0.6603774
0.6923077	0.6851852	0.6923077	0.6603774	0.6078431
0.6666667	0.6603774	0.5555556	0.5192308	0.6981132
0.6603774	0.6666667	0.6981132	0.4615385	0.5769231
0.5535714	0.4423077	0.6603774	0.5576923	0.6346154
0.5094340	0.6037736	0.7058824	0.6923077	0.4901961
0.4117647	0.4509804	0.5961538	0.4038462	0.7090909
0.7090909	0.7090909	0.7090909	0.7592593	0.6909091
0.6851852	0.8363636	0.6727273	0.6545455	0.6363636
0.6727273	0.5892857	0.7090909	0.4230769	0.6727273
0.7818182	0.6964286	0.7142857	0.6666667	0.8333333
0.5263158	0.5263158	0.5517241	0.5849057	0.4528302
0.3653846	0.3653846	0.5961538	0.5925926	0.5882353

0.5740741	0.5882353	0.5849057	0.5961538	0.6545455
0.6727273	0.6545455	0.6111111	0.6111111	0.5185185
0.6226415	0.5192308	0.7368421	0.7586207	0.6909091
0.5932203	0.6206897	0.7962963	0.3965517	0.6538462
0.6851852	0.5686275	0.7254902	0.6785714	0.6470588
0.6153846	0.5576923	0.6981132	0.6346154	0.5192308
0.5384615	0.5740741	0.6851852	0.7222222	0.6851852
1.0000000				
0.6274510	0.6938776	0.6800000	0.7058824	0.6862745
0.5882353	0.8518519	0.8181818	0.8363636	0.8679245
0.8490566	0.4901961	0.7222222	0.5098039	0.6000000
0.6734694	0.5849057	0.6538462	0.7000000	0.6296296
0.6481481	0.7037037	0.6981132	0.6226415	0.6862745
0.7200000	0.7115385	0.7200000	0.6862745	0.6000000
0.6603774	0.6862745	0.5769231	0.5400000	0.6923077
0.6862745	0.6938776	0.6923077	0.4800000	0.6000000
0.5740741	0.4600000	0.6862745	0.5800000	0.6600000
0.5294118	0.5961538	0.7000000	0.6862745	0.5102041
0.4285714	0.4693878	0.6200000	0.4200000	0.7692308
0.7692308	0.7692308	0.7358491	0.7884615	0.7500000
0.6481481	0.8000000	0.6666667	0.6481481	0.6296296
0.6666667	0.6415094	0.7037037	0.4400000	0.6666667
0.7142857	0.6607143	0.6785714	0.6603774	0.7636364
0.5454545	0.5454545	0.5714286	0.5471698	0.4150943
0.3800000	0.3800000	0.5769231	0.5555556	0.5686275
0.5370370	0.5686275	0.5769231	0.5882353	0.6792453
0.6666667	0.6481481	0.6037736	0.6037736	0.4814815
0.6470588	0.5400000	0.7017544	0.7543860	0.6851852
0.5593220	0.6140351	0.8269231	0.4363636	0.6800000
0.7115385	0.5918367	0.7400000	0.7037037	0.6400000
0.6400000	0.5490196	0.7254902	0.6600000	0.5400000
0.5294118	0.5090909	0.6481481	0.6545455	0.6481481
0.8867925	1.0000000			
0.8000000	0.8461538	0.8717949	0.9000000	0.9230769
0.7073171	0.6481481	0.6481481	0.6071429	0.6296296
0.6415094	0.6666667	0.6734694	0.5714286	0.5714286
0.8205128	0.7380952	0.8292683	0.9210526	0.6382979
0.5294118	0.5283019	0.5490196	0.5625000	0.9230769
0.8750000	0.9024390	0.9230769	0.9230769	0.6829268
0.8780488	0.8750000	0.7317073	0.6500000	0.9743590
0.8750000	0.8947368	0.8780488	0.5750000	0.7250000
0.7619048	0.5897436	0.6304348	0.7000000	0.8461538
0.6750000	0.7142857	0.8048780	0.7441860	0.5365854
0.5675676	0.5641026	0.6666667	0.5384615	0.7608696
0.7608696	0.7608696	0.6875000	0.7446809	0.7391304
0.6595745	0.6000000	0.6808511	0.6595745	0.6382979
0.6808511	0.6888889	0.5576923	0.3863636	0.5192308
0.5178571	0.4642857	0.4821429	0.4807692	0.6538462
0.4509804	0.4509804	0.4259259	0.6136364	0.4883721
0.3488372	0.3488372	0.5777778	0.5208333	0.5333333



0.5000000	0.5333333	0.5434783	0.5555556	0.5600000
0.5192308	0.5294118	0.4800000	0.6818182	0.5333333
0.8250000	0.6500000	0.5357143	0.5344828	0.5384615
0.3965517	0.4210526	0.6153846	0.3877551	0.8250000
0.8571429	0.7179487	0.8536585	0.8000000	0.7317073
0.7317073	0.6585366	0.9743590	0.8000000	0.6097561
0.5952381	0.6000000	0.6595745	0.6326531	0.6595745
0.6792453	0.7058824	1.0000000		
0.3636364	0.4150943	0.4339623	0.4629630	0.4444444
0.4038462	0.6428571	0.6428571	0.6315789	0.6545455
0.6666667	0.3076923	0.5454545	0.3529412	0.4545455
0.4230769	0.3571429	0.4181818	0.4339623	0.5094340
0.5576923	0.6153846	0.6078431	0.5294118	0.4444444
0.5000000	0.4727273	0.4716981	0.4444444	0.4693878
0.4814815	0.4716981	0.3962264	0.3800000	0.4545455
0.4716981	0.4150943	0.4545455	0.2941176	0.4117647
0.4259259	0.3541667	0.5294118	0.4489796	0.4423077
0.3207547	0.3636364	0.4528302	0.5000000	0.3469388
0.2708333	0.2800000	0.4897959	0.3404255	0.5272727
0.5272727	0.5272727	0.5272727	0.5740741	0.5090909
0.5283019	0.6545455	0.5471698	0.5000000	0.5094340
0.5185185	0.4905660	0.6153846	0.3617021	0.6734694
0.6603774	0.6346154	0.6862745	0.7021277	0.6181818
0.6382979	0.6739130	0.6666667	0.3962264	0.3673469
0.3260870	0.3555556	0.5208333	0.4615385	0.4285714
0.4423077	0.4285714	0.4509804	0.4400000	0.5882353
0.5471698	0.5576923	0.5400000	0.4528302	0.4117647
0.4615385	0.3529412	0.6481481	0.6428571	0.6600000
0.6470588	0.6800000	0.6111111	0.3653846	0.4339623
0.4464286	0.4000000	0.4905660	0.5000000	0.4800000
0.5102041	0.4791667	0.4814815	0.4705882	0.4375000
0.4583333	0.5000000	0.5000000	0.5090909	0.5576923
0.6428571	0.6071429	0.4629630	1.0000000	
0.5106383	0.5434783	0.5319149	0.5625000	0.5416667
0.5681818	0.6603774	0.6603774	0.6792453	0.7058824
0.7200000	0.4222222	0.6200000	0.4772727	0.5200000
0.4893617	0.4117647	0.5102041	0.5208333	0.5510204
0.6739130	0.7391304	0.7333333	0.7619048	0.5744681
0.5744681	0.6041667	0.5416667	0.5416667	0.5813953
0.5510204	0.5416667	0.5555556	0.4772727	0.5200000
0.5416667	0.5777778	0.5510204	0.4418605	0.5111111
0.5869565	0.4186047	0.5744681	0.5952381	0.5106383
0.4347826	0.5106383	0.5869565	0.6444444	0.4761905
0.3488372	0.3636364	0.6428571	0.4750000	0.6326531
0.6326531	0.6326531	0.6000000	0.6200000	0.6808511
0.5400000	0.6730769	0.6956522	0.6739130	0.6888889
0.6956522	0.5625000	0.8181818	0.4634146	0.8139535
0.7500000	0.7234043	0.7446809	0.7272727	0.6666667
0.6590909	0.6222222	0.6521739	0.4583333	0.4651163
0.3902439	0.4250000	0.6428571	0.6363636	0.6097561

---

0.6136364	0.6097561	0.6279070	0.6190476	0.8333333
0.7727273	0.7500000	0.6590909	0.5208333	0.4680851
0.5652174	0.4772727	0.6346154	0.6923077	0.7555556
0.6326531	0.7021277	0.6600000	0.3958333	0.5319149
0.5714286	0.5000000	0.5625000	0.6000000	0.5555556
0.5217391	0.5581395	0.5510204	0.5434783	0.6250000
0.5348837	0.4791667	0.5098039	0.5192308	0.5400000
0.6296296	0.6538462	0.5306122	0.6250000	1.0000000
0.7073171	0.7073171	0.6904762	0.7619048	0.7804878
0.7894737	0.6730769	0.5818182	0.6000000	0.6226415
0.6037736	0.5750000	0.5686275	0.6000000	0.5625000
0.7250000	0.5777778	0.6590909	0.7560976	0.6304348
0.5510204	0.5800000	0.6041667	0.5869565	0.7804878
0.7380952	0.7674419	0.7380952	0.7804878	0.7179487
0.6666667	0.6976744	0.8157895	0.6000000	0.7441860
0.7380952	0.7948718	0.7441860	0.6052632	0.6341463
0.7560976	0.5384615	0.5531915	0.7368421	0.7073171
0.6250000	0.7073171	0.7142857	0.6976744	0.5250000
0.5405405	0.5526316	0.7894737	0.6111111	0.6808511
0.6458333	0.6458333	0.6458333	0.6000000	0.6595745
0.6521739	0.5636364	0.7906977	0.7674419	0.7441860
0.7906977	0.7619048	0.6122449	0.4047619	0.6041667
0.5961538	0.5384615	0.5576923	0.5306122	0.6153846
0.5000000	0.5000000	0.5000000	0.4680851	0.3777778
0.3333333	0.3333333	0.5333333	0.5106383	0.5227273
0.4893617	0.5227273	0.5333333	0.5454545	0.6170213
0.6041667	0.6170213	0.5000000	0.5000000	0.4468085
0.6904762	0.6842105	0.5555556	0.6111111	0.5918367
0.4629630	0.4905660	0.5769231	0.3750000	0.7317073
0.7674419	0.6250000	0.7209302	0.7173913	0.7692308
0.7250000	0.6923077	0.7441860	0.7500000	0.6842105
0.5476190	0.4583333	0.6888889	0.6956522	0.6888889
0.6730769	0.7000000	0.7619048	0.4528302	0.6222222
1.0000000				
0.7435897	0.7894737	0.7692308	0.7560976	0.7750000
0.6923077	0.6346154	0.6037736	0.5925926	0.6153846
0.6274510	0.6052632	0.5918367	0.5897436	0.6222222
0.6750000	0.6428571	0.7317073	0.7500000	0.6590909
0.5744681	0.5714286	0.6304348	0.5777778	0.7750000
0.8205128	0.8048780	0.7750000	0.7750000	0.7567568
0.7380952	0.8205128	0.7179487	0.6315789	0.7804878
0.8205128	0.8378378	0.8250000	0.6388889	0.6666667
0.7500000	0.6571429	0.6511628	0.7777778	0.7435897
0.6578947	0.6585366	0.7500000	0.6904762	0.5526316
0.5714286	0.5405405	0.7368421	0.6000000	0.6739130
0.6739130	0.6739130	0.6382979	0.6595745	0.7272727
0.6444444	0.5555556	0.6666667	0.6818182	0.6590909
0.7045455	0.7142857	0.5714286	0.4615385	0.5625000
0.5283019	0.5000000	0.4905660	0.4897959	0.6400000
0.4583333	0.4583333	0.4313725	0.5581395	0.5000000

0.4210526	0.3846154	0.5952381	0.5333333	0.5476190
0.5111111	0.5476190	0.5581395	0.5714286	0.5744681
0.5306122	0.5416667	0.4893617	0.5909091	0.5348837
0.7250000	0.6756757	0.5185185	0.5454545	0.5510204
0.4000000	0.4259259	0.6000000	0.3913043	0.7692308
0.7619048	0.7027027	0.8000000	0.7111111	0.7631579
0.8108108	0.7297297	0.8250000	0.7435897	0.7222222
0.6578947	0.5813953	0.6818182	0.6521739	0.6444444
0.6346154	0.6600000	0.8000000	0.4705882	0.5777778
0.7500000	1.0000000			
0.6274510	0.6938776	0.6800000	0.7058824	0.6862745
0.5882353	0.8867925	0.8518519	0.8703704	0.9038462
0.8846154	0.4901961	0.7222222	0.4807692	0.6000000
0.6734694	0.5849057	0.6538462	0.7000000	0.6296296
0.6481481	0.7358491	0.7307692	0.6538462	0.6862745
0.7200000	0.7115385	0.7200000	0.6862745	0.6000000
0.6603774	0.6862745	0.5769231	0.5400000	0.6923077
0.6862745	0.6938776	0.6923077	0.4800000	0.6000000
0.5740741	0.4600000	0.6862745	0.5800000	0.6600000
0.5294118	0.5961538	0.7000000	0.6862745	0.5102041
0.4285714	0.4693878	0.6200000	0.4200000	0.7358491
0.7358491	0.7358491	0.7037037	0.7547170	0.7169811
0.6481481	0.8333333	0.6981132	0.6792453	0.6603774
0.6981132	0.6111111	0.7358491	0.4117647	0.6981132
0.7454545	0.6909091	0.7090909	0.6923077	0.7962963
0.5740741	0.5740741	0.6000000	0.5471698	0.4150943
0.3800000	0.3800000	0.5769231	0.5555556	0.5686275
0.5370370	0.5686275	0.5769231	0.5882353	0.7115385
0.6981132	0.6792453	0.6346154	0.6037736	0.5094340
0.6470588	0.5400000	0.7321429	0.7857143	0.7169811
0.5862069	0.6428571	0.8627451	0.4629630	0.6800000
0.7115385	0.5918367	0.7400000	0.7037037	0.6400000
0.6400000	0.5490196	0.7254902	0.6600000	0.5400000
0.5294118	0.5090909	0.6481481	0.6545455	0.6481481
0.8867925	0.9600000	0.7058824	0.6071429	0.6538462
0.7000000	0.6600000	1.0000000		
0.5581395	0.5952381	0.5813953	0.6136364	0.6279070
0.6666667	0.5849057	0.5555556	0.5454545	0.5660377
0.5769231	0.5789474	0.5098039	0.6052632	0.5319149
0.5714286	0.4782609	0.5555556	0.6046512	0.6363636
0.5869565	0.6170213	0.6086957	0.5555556	0.6666667
0.6666667	0.6590909	0.6279070	0.6279070	0.7297297
0.6000000	0.6279070	0.6500000	0.6486486	0.6000000
0.6666667	0.6341463	0.6744186	0.6111111	0.5609756
0.6829268	0.5405405	0.6279070	0.7500000	0.6341463
0.6315789	0.5952381	0.6428571	0.6666667	0.4871795
0.5000000	0.5135135	0.8055556	0.6176471	0.5833333
0.5510204	0.5510204	0.5510204	0.5400000	0.5625000
0.5869565	0.5370370	0.7209302	0.6976744	0.7142857
0.7209302	0.6904762	0.5833333	0.4358974	0.6086957

0.5686275	0.5400000	0.5600000	0.5652174	0.6200000
0.4680851	0.5000000	0.4693878	0.4666667	0.3720930
0.3589744	0.3250000	0.5348837	0.5454545	0.5609756
0.5227273	0.5609756	0.5714286	0.5853659	0.5869565
0.5744681	0.5869565	0.5000000	0.4680851	0.4130435
0.6190476	0.6052632	0.5576923	0.5849057	0.5957447
0.4901961	0.5200000	0.5490196	0.3404255	0.6585366
0.6590909	0.6756757	0.6511628	0.6521739	0.7368421
0.7368421	0.7027027	0.6363636	0.7179487	0.7428571
0.5121951	0.4565217	0.6222222	0.5957447	0.6222222
0.5849057	0.6078431	0.6136364	0.5102041	0.5909091
0.7692308	0.7179487	0.6078431	1.0000000	
0.6904762	0.7750000	0.7560976	0.8292683	0.8500000
0.6428571	0.6296296	0.6296296	0.5892857	0.6111111
0.6226415	0.5609756	0.6875000	0.5476190	0.5510204
0.7500000	0.6000000	0.7619048	0.8000000	0.6170213
0.5400000	0.5384615	0.5600000	0.5744681	0.8048780
0.8500000	0.8780488	0.8500000	0.8500000	0.6585366
0.8095238	0.8048780	0.7073171	0.6250000	0.8095238
0.8500000	0.7750000	0.8095238	0.5897436	0.6585366
0.6590909	0.4878049	0.5744681	0.7179487	0.7317073
0.6500000	0.6904762	0.7380952	0.7209302	0.4761905
0.5000000	0.5000000	0.6829268	0.5128205	0.7777778
0.7391304	0.7391304	0.7021277	0.6875000	0.7173913
0.6382979	0.5818182	0.7333333	0.7111111	0.6888889
0.7333333	0.7441860	0.5686275	0.3953488	0.5600000
0.5555556	0.5283019	0.5471698	0.5200000	0.6346154
0.5208333	0.5208333	0.4901961	0.5217391	0.4651163
0.3255814	0.3255814	0.5909091	0.5319149	0.5227273
0.5106383	0.5227273	0.5555556	0.5454545	0.5714286
0.5600000	0.5714286	0.4897959	0.5869565	0.4468085
0.8461538	0.6666667	0.5740741	0.5714286	0.5490196
0.4545455	0.4814815	0.5961538	0.3958333	0.8000000
0.7906977	0.7368421	0.8292683	0.7777778	0.7073171
0.7073171	0.6750000	0.8536585	0.8205128	0.6250000
0.5000000	0.5777778	0.6382979	0.6122449	0.6382979
0.6296296	0.6538462	0.8292683	0.4716981	0.5416667
0.7380952	0.6904762	0.6538462	0.6666667	1.0000000
0.5714286	0.6382979	0.6250000	0.6530612	0.6666667
0.4705882	0.7735849	0.8076923	0.8269231	0.8600000
0.8775510	0.5106383	0.7058824	0.4791667	0.6400000
0.5833333	0.6458333	0.6666667	0.6122449	0.6400000
0.7291667	0.7551020	0.7500000	0.6666667	0.6326531
0.6666667	0.6938776	0.6326531	0.6666667	0.5744681
0.6400000	0.6875000	0.4901961	0.4791667	0.6400000
0.6666667	0.6382979	0.6400000	0.4680851	0.5957447
0.5490196	0.4782609	0.6326531	0.5531915	0.5714286
0.5208333	0.5714286	0.6326531	0.6666667	0.4782609
0.4130435	0.4565217	0.5510204	0.4042553	0.7200000
0.7200000	0.7200000	0.7058824	0.7755102	0.7346939

0.6346154	0.7884615	0.6153846	0.6274510	0.6274510
0.6470588	0.5576923	0.7200000	0.4255319	0.6800000
0.6363636	0.6730769	0.6296296	0.6600000	0.7843137
0.5490196	0.5192308	0.5660377	0.5833333	0.4680851
0.3913043	0.3913043	0.6304348	0.6250000	0.6000000
0.6041667	0.6000000	0.6170213	0.6086957	0.6938776
0.7142857	0.6938776	0.6458333	0.6326531	0.5625000
0.6250000	0.5319149	0.6851852	0.6785714	0.7000000
0.5636364	0.6226415	0.7800000	0.4509804	0.6250000
0.6600000	0.5652174	0.6875000	0.6862745	0.5833333
0.5833333	0.5208333	0.6734694	0.6041667	0.5106383
0.5652174	0.5714286	0.6274510	0.6346154	0.6600000
0.7735849	0.8039216	0.6530612	0.5849057	0.6666667
0.5490196	0.6382979	0.8039216	0.5200000	0.6000000
1.0000000				
0.5853659	0.7105263	0.6500000	0.6428571	0.6585366
0.6578947	0.5471698	0.5769231	0.5660377	0.5882353
0.6000000	0.5675676	0.5306122	0.5945946	0.5217391
0.6000000	0.5348837	0.5813953	0.6341463	0.5909091
0.6136364	0.6086957	0.6744186	0.6585366	0.6585366
0.7000000	0.6904762	0.6585366	0.6585366	0.6756757
0.5909091	0.6585366	0.6842105	0.5945946	0.6279070
0.7000000	0.6666667	0.7073171	0.6470588	0.6315789
0.6341463	0.5714286	0.5454545	0.7941176	0.6250000
0.6216216	0.6250000	0.6750000	0.6585366	0.5135135
0.5294118	0.5882353	0.7500000	0.6060606	0.6444444
0.6086957	0.6086957	0.6086957	0.5957447	0.6222222
0.5434783	0.5283019	0.6744186	0.6904762	0.6666667
0.7142857	0.6829268	0.6086957	0.5000000	0.6000000
0.5294118	0.5625000	0.5200000	0.5217391	0.5800000
0.5227273	0.5227273	0.4583333	0.4222222	0.3571429
0.4166667	0.3783784	0.6410256	0.6097561	0.5897436
0.5853659	0.5897436	0.6000000	0.6153846	0.5777778
0.6363636	0.6511628	0.5581395	0.4565217	0.4090909
0.6500000	0.5526316	0.5192308	0.5471698	0.5531915
0.4230769	0.4800000	0.5714286	0.3863636	0.6923077
0.6904762	0.6666667	0.6428571	0.6818182	0.8285714
0.7297297	0.7428571	0.6666667	0.7567568	0.6857143
0.4634146	0.4444444	0.5777778	0.5531915	0.5777778
0.5769231	0.6000000	0.6428571	0.4693878	0.5813953
0.7179487	0.7105263	0.6000000	0.7297297	0.7000000
0.5744681	1.0000000			
0.6666667	0.7567568	0.7368421	0.7692308	0.7435897
0.5750000	0.5769231	0.6078431	0.5660377	0.5882353
0.6000000	0.6111111	0.5625000	0.5128205	0.4583333
0.6842105	0.6097561	0.7000000	0.7631579	0.5555556
0.5106383	0.5102041	0.5652174	0.5454545	0.7435897
0.8378378	0.7750000	0.7894737	0.7435897	0.6315789
0.7073171	0.7894737	0.6000000	0.6388889	0.7500000
0.7894737	0.7567568	0.7948718	0.5555556	0.7714286

0.6341463	0.5714286	0.5813953	0.6944444	0.7567568
0.6216216	0.6250000	0.7179487	0.7000000	0.4736842
0.4857143	0.5428571	0.6578947	0.4722222	0.6444444
0.6444444	0.6444444	0.5744681	0.6666667	0.6222222
0.5106383	0.5576923	0.6000000	0.5777778	0.5555556
0.6000000	0.6428571	0.5102041	0.4210526	0.5319149
0.5000000	0.4705882	0.4615385	0.4893617	0.6122449
0.5227273	0.5581395	0.4583333	0.6000000	0.4250000
0.3783784	0.4166667	0.5609756	0.5000000	0.5121951
0.4772727	0.5121951	0.5238095	0.5365854	0.5106383
0.5000000	0.5106383	0.4565217	0.6341463	0.5500000
0.6923077	0.5128205	0.4363636	0.4642857	0.5869565
0.4230769	0.4230769	0.5714286	0.3555556	0.7837838
0.7750000	0.7142857	0.7692308	0.7209302	0.7777778
0.7297297	0.6486486	0.7948718	0.8055556	0.5945946
0.5789474	0.5853659	0.5434783	0.5208333	0.5434783
0.6078431	0.6326531	0.7692308	0.5000000	0.5454545
0.6341463	0.7105263	0.6326531	0.6000000	0.7000000
0.6086957	0.6756757	1.0000000		
0.5744681	0.6086957	0.5625000	0.6595745	0.6739130
0.5652174	0.7500000	0.7843137	0.7692308	0.8000000
0.8163265	0.4565217	0.6800000	0.4782609	0.5800000
0.6222222	0.5306122	0.5714286	0.6170213	0.6122449
0.7391304	0.8043478	0.8409091	0.7500000	0.6041667
0.6739130	0.6326531	0.6041667	0.6739130	0.6511628
0.5800000	0.6382979	0.5869565	0.5111111	0.6122449
0.6739130	0.6444444	0.6122449	0.5116279	0.5434783
0.5833333	0.4545455	0.6382979	0.6666667	0.6086957
0.5000000	0.5416667	0.6170213	0.6382979	0.5853659
0.4878049	0.5000000	0.6744186	0.5121951	0.6938776
0.6600000	0.6600000	0.6938776	0.7142857	0.6734694
0.5686275	0.7307692	0.7234043	0.7391304	0.7173913
0.7608696	0.6250000	0.7659574	0.4651163	0.7608696
0.6730769	0.6800000	0.6666667	0.7173913	0.7959184
0.5833333	0.5833333	0.5800000	0.4600000	0.4042553
0.3953488	0.3636364	0.7142857	0.6666667	0.6428571
0.6444444	0.6428571	0.6590909	0.6511628	0.7391304
0.7608696	0.7391304	0.7272727	0.4901961	0.4791667
0.6304348	0.5111111	0.6923077	0.6851852	0.6734694
0.5660377	0.6274510	0.7551020	0.4285714	0.5957447
0.6000000	0.6046512	0.6595745	0.6600000	0.6976744
0.6976744	0.6279070	0.6122449	0.6444444	0.6190476
0.5000000	0.5102041	0.5686275	0.5769231	0.6000000
0.7169811	0.7115385	0.6250000	0.6200000	0.6739130
0.6521739	0.6818182	0.7450980	0.6222222	0.6041667
0.7291667	0.6904762	0.5777778	1.0000000	
0.7435897	0.7894737	0.7250000	0.7560976	0.7317073
0.5714286	0.5740741	0.6037736	0.5925926	0.5849057
0.5961538	0.5641026	0.6250000	0.4761905	0.4897959
0.6750000	0.5681818	0.7317073	0.8157895	0.5208333

0.5102041	0.5098039	0.5306122	0.5434783	0.7750000
0.8205128	0.7619048	0.8205128	0.7317073	0.6250000
0.8250000	0.7750000	0.5952381	0.6315789	0.8250000
0.7750000	0.7894737	0.8250000	0.5526316	0.6250000
0.6279070	0.4871795	0.6136364	0.7297297	0.7894737
0.5750000	0.5813953	0.8421053	0.7750000	0.4750000
0.5000000	0.5000000	0.6500000	0.5135135	0.6382979
0.6382979	0.6382979	0.5714286	0.6250000	0.6521739
0.5416667	0.5555556	0.5957447	0.6086957	0.6222222
0.6304348	0.6363636	0.5400000	0.4250000	0.5000000
0.5283019	0.4716981	0.4629630	0.4600000	0.6078431
0.4583333	0.4583333	0.4313725	0.4888889	0.4634146
0.3500000	0.3170732	0.5952381	0.5000000	0.5116279
0.4782609	0.5116279	0.5227273	0.5348837	0.5416667
0.5000000	0.5102041	0.4583333	0.5555556	0.4772727
0.8157895	0.5500000	0.5185185	0.5178571	0.4901961
0.3750000	0.4000000	0.6000000	0.3333333	0.7692308
0.7209302	0.8000000	0.7560976	0.6739130	0.6750000
0.6750000	0.6842105	0.8250000	0.7435897	0.6315789
0.4651163	0.5454545	0.5744681	0.5510204	0.5416667
0.6346154	0.6274510	0.8000000	0.4705882	0.5106383
0.6279070	0.7435897	0.6274510	0.6341463	0.8205128
0.5714286	0.6666667	0.7105263	0.5744681	1.0000000
0.4642857	0.5185185	0.5090909	0.5636364	0.5454545
0.5094340	0.8000000	0.7678571	0.7543860	0.7818182
0.7962963	0.3888889	0.6727273	0.4339623	0.5818182
0.5000000	0.4561404	0.5178571	0.5272727	0.6111111
0.6296296	0.7500000	0.7115385	0.6666667	0.5740741
0.5740741	0.6000000	0.5454545	0.5454545	0.5490196
0.5535714	0.5454545	0.5000000	0.4074074	0.5263158
0.5454545	0.5185185	0.5535714	0.3773585	0.4905660
0.5272727	0.3584906	0.5178571	0.5294118	0.5185185
0.4000000	0.4642857	0.5555556	0.5740741	0.3773585
0.3018868	0.3148148	0.5686275	0.3725490	0.6250000
0.6250000	0.6250000	0.6250000	0.6140351	0.6071429
0.6296296	0.7500000	0.6792453	0.6603774	0.6730769
0.6792453	0.5636364	0.7843137	0.3921569	0.7800000
0.8627451	0.8400000	0.8600000	0.8125000	0.7142857
0.6800000	0.6800000	0.7058824	0.4727273	0.4509804
0.3333333	0.3600000	0.5384615	0.5370370	0.5098039
0.5185185	0.5098039	0.5283019	0.5192308	0.7254902
0.7115385	0.7254902	0.6470588	0.5272727	0.4629630
0.5370370	0.4615385	0.7777778	0.8333333	0.8367347
0.7169811	0.7843137	0.7407407	0.4444444	0.5370370
0.5438596	0.4528302	0.5925926	0.5964912	0.5283019
0.5283019	0.5294118	0.5535714	0.5471698	0.4901961
0.5098039	0.5185185	0.6000000	0.6071429	0.6000000
0.7368421	0.7321429	0.5357143	0.7800000	0.7346939
0.5849057	0.5471698	0.7636364	0.5882353	0.5740741

0.6851852	0.5490196	0.5192308	0.6923077	0.5185185
1.0000000				
0.4642857	0.5185185	0.5090909	0.5636364	0.5454545
0.5094340	0.8000000	0.7678571	0.7543860	0.7818182
0.7962963	0.3888889	0.6727273	0.4339623	0.5818182
0.5000000	0.4561404	0.5178571	0.5272727	0.6111111
0.6296296	0.7500000	0.7115385	0.6666667	0.5740741
0.5740741	0.6000000	0.5454545	0.5454545	0.5490196
0.5535714	0.5454545	0.5000000	0.4074074	0.5263158
0.5454545	0.5185185	0.5535714	0.3773585	0.4905660
0.5272727	0.3584906	0.5178571	0.5294118	0.5185185
0.4000000	0.4642857	0.5555556	0.5740741	0.3773585
0.3018868	0.3148148	0.5686275	0.3725490	0.6250000
0.6250000	0.6250000	0.6250000	0.6140351	0.6071429
0.6296296	0.7500000	0.6792453	0.6603774	0.6730769
0.6792453	0.5636364	0.7843137	0.3921569	0.7800000
0.8627451	0.8400000	0.8600000	0.8125000	0.7142857
0.6800000	0.6800000	0.7058824	0.4727273	0.4509804
0.3333333	0.3600000	0.5384615	0.5370370	0.5098039
0.5185185	0.5098039	0.5283019	0.5192308	0.7254902
0.7115385	0.7254902	0.6470588	0.5272727	0.4629630
0.5370370	0.4615385	0.7777778	0.8333333	0.8367347
0.7169811	0.7843137	0.7407407	0.4444444	0.5370370
0.5438596	0.4528302	0.5925926	0.5964912	0.5283019
0.5283019	0.5294118	0.5535714	0.5471698	0.4901961
0.5098039	0.5185185	0.6000000	0.6071429	0.6000000
0.7368421	0.7321429	0.5357143	0.7800000	0.7346939
0.5849057	0.5471698	0.7636364	0.5882353	0.5740741
0.6851852	0.5490196	0.5192308	0.6923077	0.5185185
1.0000000	1.0000000			
0.4772727	0.5476190	0.5000000	0.5000000	0.4782609
0.5000000	0.5769231	0.5769231	0.5961538	0.6200000
0.6326531	0.4500000	0.5306122	0.5128205	0.4893617
0.4883721	0.4042553	0.4782609	0.5227273	0.4893617
0.6136364	0.6818182	0.7142857	0.7000000	0.5111111
0.5454545	0.5106383	0.5111111	0.4782609	0.5121951
0.4893617	0.5111111	0.4222222	0.5128205	0.4893617
0.5111111	0.5116279	0.5217391	0.4736842	0.5121951
0.4888889	0.4864865	0.6190476	0.5641026	0.5476190
0.4634146	0.4444444	0.5581395	0.6190476	0.5135135
0.4054054	0.4594595	0.5750000	0.4324324	0.5416667
0.5416667	0.5416667	0.5102041	0.5625000	0.5531915
0.4791667	0.5576923	0.5319149	0.5434783	0.5555556
0.5652174	0.5000000	0.7209302	0.5000000	0.5652174
0.5600000	0.5625000	0.5200000	0.5217391	0.5800000
0.4888889	0.4888889	0.4583333	0.3913043	0.3255814
0.5000000	0.4571429	0.6842105	0.6500000	0.7222222
0.6250000	0.7222222	0.7297297	0.7500000	0.6904762
0.7142857	0.6904762	0.7179487	0.4255319	0.3777778
0.5000000	0.4285714	0.5490196	0.5769231	0.5869565



0.4230769	0.4800000	0.6382979	0.3260870	0.5000000
0.5106383	0.5641026	0.5333333	0.5102041	0.6000000
0.5238095	0.5500000	0.5217391	0.5348837	0.5945946
0.3953488	0.3829787	0.4489796	0.4313725	0.4489796
0.5769231	0.6326531	0.5000000	0.4693878	0.6585366
0.5227273	0.5476190	0.6326531	0.5609756	0.4468085
0.6086957	0.5897436	0.5121951	0.6136364	0.5116279
0.5490196	0.5490196	1.0000000		
0.5000000	0.5714286	0.5227273	0.5217391	0.5333333
0.4883721	0.5370370	0.5370370	0.5555556	0.5769231
0.5882353	0.4750000	0.5510204	0.5789474	0.5106383
0.5476190	0.4255319	0.5000000	0.5454545	0.5106383
0.7142857	0.7045455	0.6976744	0.6829268	0.5333333
0.5681818	0.5319149	0.5333333	0.5333333	0.5750000
0.5106383	0.5333333	0.4772727	0.5789474	0.5106383
0.5681818	0.5348837	0.5434783	0.5000000	0.5365854
0.5111111	0.5135135	0.6428571	0.6315789	0.5714286
0.4878049	0.4666667	0.5454545	0.6046512	0.5405405
0.4324324	0.4473684	0.6000000	0.4594595	0.5957447
0.5625000	0.5625000	0.5957447	0.6170213	0.5744681
0.5319149	0.5185185	0.5869565	0.6000000	0.6136364
0.6222222	0.5555556	0.6666667	0.5714286	0.5869565
0.5490196	0.5833333	0.5400000	0.5106383	0.6326531
0.4782609	0.4782609	0.4489796	0.4444444	0.3809524
0.4857143	0.4444444	0.8055556	0.8108108	0.8529412
0.7837838	0.8529412	0.8571429	0.8823529	0.6363636
0.7380952	0.6744186	0.7000000	0.4468085	0.4000000
0.5581395	0.4878049	0.5686275	0.5370370	0.5416667
0.4423077	0.4705882	0.5918367	0.2916667	0.5227273
0.5319149	0.6315789	0.5681818	0.5000000	0.6666667
0.5853659	0.6578947	0.5434783	0.5952381	0.6666667
0.4186047	0.4347826	0.5000000	0.4800000	0.5000000
0.5961538	0.5882353	0.5217391	0.4600000	0.6046512
0.5454545	0.5714286	0.5882353	0.6250000	0.5000000
0.5957447	0.6153846	0.5365854	0.6363636	0.5348837
0.5094340	0.5094340	0.8000000	1.0000000	
0.5000000	0.5714286	0.5227273	0.5217391	0.5333333
0.4883721	0.5370370	0.5370370	0.5555556	0.5769231
0.5882353	0.4750000	0.5510204	0.5789474	0.5106383
0.5476190	0.4255319	0.5000000	0.5454545	0.5106383
0.7142857	0.7045455	0.6976744	0.6829268	0.5333333
0.5681818	0.5319149	0.5333333	0.5333333	0.5750000
0.5106383	0.5333333	0.4772727	0.5789474	0.5106383
0.5681818	0.5348837	0.5434783	0.5000000	0.5365854
0.5111111	0.5135135	0.6428571	0.6315789	0.5714286
0.4878049	0.4666667	0.5454545	0.6046512	0.5405405
0.4324324	0.4473684	0.6000000	0.4594595	0.5957447
0.5625000	0.5625000	0.5957447	0.6170213	0.5744681
0.5319149	0.5185185	0.5869565	0.6000000	0.6136364
0.6222222	0.5555556	0.6666667	0.5714286	0.5869565

0.5490196	0.5833333	0.5400000	0.5106383	0.6326531
0.4782609	0.4782609	0.4489796	0.4444444	0.3809524
0.4857143	0.4444444	0.8055556	0.8108108	0.8529412
0.7837838	0.8529412	0.8571429	0.8823529	0.6363636
0.7380952	0.6744186	0.7000000	0.4468085	0.4000000
0.5581395	0.4878049	0.5686275	0.5370370	0.5416667
0.4423077	0.4705882	0.5918367	0.2916667	0.5227273
0.5319149	0.6315789	0.5681818	0.5000000	0.6666667
0.5853659	0.6578947	0.5434783	0.5952381	0.6666667
0.4186047	0.4347826	0.5000000	0.4800000	0.5000000
0.5961538	0.5882353	0.5217391	0.4600000	0.6046512
0.5454545	0.5714286	0.5882353	0.6250000	0.5000000
0.5957447	0.6153846	0.5365854	0.6363636	0.5348837
0.5094340	0.5094340	0.8000000	1.0000000	1.0000000
0.4583333	0.5217391	0.4791667	0.5416667	0.5531915
0.4468085	0.6111111	0.6415094	0.6296296	0.6538462
0.6666667	0.4000000	0.5686275	0.4545455	0.4423077
0.5000000	0.3921569	0.4897959	0.5000000	0.4705882
0.6888889	0.7954545	0.7906977	0.7380952	0.5208333
0.5869565	0.5510204	0.5208333	0.5531915	0.5227273
0.5306122	0.5531915	0.4680851	0.4545455	0.5000000
0.5869565	0.5217391	0.5306122	0.4186047	0.4888889
0.5000000	0.4285714	0.5531915	0.6097561	0.5217391
0.4130435	0.4285714	0.5652174	0.5869565	0.4523810
0.3571429	0.4047619	0.6190476	0.4146341	0.6122449
0.5800000	0.5800000	0.6122449	0.6326531	0.5918367
0.4615385	0.5925926	0.6382979	0.6521739	0.6666667
0.6739130	0.5416667	0.7173913	0.5128205	0.6382979
0.6274510	0.6666667	0.6200000	0.5957447	0.6800000
0.6000000	0.6000000	0.5306122	0.4081633	0.3777778
0.3658537	0.3333333	0.7692308	0.7317073	0.7368421
0.7073171	0.7368421	0.7692308	0.7631579	0.6888889
0.7906977	0.7272727	0.7142857	0.4693878	0.3958333
0.6136364	0.3913043	0.6470588	0.6111111	0.6250000
0.5192308	0.5490196	0.6734694	0.4042553	0.5106383
0.5200000	0.5476190	0.5531915	0.5490196	0.6829268
0.5681818	0.6097561	0.5306122	0.5555556	0.6000000
0.4130435	0.4583333	0.4339623	0.4181818	0.4339623
0.5818182	0.6037736	0.5102041	0.4807692	0.6590909
0.5319149	0.5555556	0.6346154	0.5681818	0.5208333
0.6122449	0.6341463	0.5227273	0.7272727	0.5217391
0.5849057	0.5849057	0.6750000	0.7435897	0.7435897
1.0000000				
0.5217391	0.5909091	0.5434783	0.5744681	0.5869565
0.4782609	0.6730769	0.6730769	0.6923077	0.7200000
0.7346939	0.4222222	0.6200000	0.5116279	0.5000000
0.5681818	0.4489796	0.5531915	0.5652174	0.5306122
0.7111111	0.8181818	0.8780488	0.8048780	0.5416667
0.6222222	0.5833333	0.5531915	0.5869565	0.5813953
0.5510204	0.5869565	0.5000000	0.5116279	0.5306122

0.6222222	0.5555556	0.5625000	0.4523810	0.5581395
0.5208333	0.4634146	0.5869565	0.6341463	0.5777778
0.4444444	0.4583333	0.5869565	0.6818182	0.4878049
0.3902439	0.4390244	0.6428571	0.4390244	0.6458333
0.6122449	0.6122449	0.6458333	0.6666667	0.6250000
0.5510204	0.6538462	0.6739130	0.6888889	0.6888889
0.7111111	0.6086957	0.8181818	0.5789474	0.6956522
0.6800000	0.7234043	0.6734694	0.6521739	0.7142857
0.6222222	0.6222222	0.5833333	0.4375000	0.4000000
0.4358974	0.4000000	0.8421053	0.7142857	0.7179487
0.6904762	0.7179487	0.7500000	0.7435897	0.7906977
0.9024390	0.8333333	0.7804878	0.5000000	0.4565217
0.6000000	0.4545455	0.7000000	0.6603774	0.6808511
0.5686275	0.6000000	0.6938776	0.4042553	0.5434783
0.5510204	0.5714286	0.6222222	0.5800000	0.7250000
0.6046512	0.6341463	0.5625000	0.5909091	0.6250000
0.4444444	0.4893617	0.5200000	0.5000000	0.5200000
0.6415094	0.6666667	0.5416667	0.5294118	0.7209302
0.6000000	0.5909091	0.7000000	0.5909091	0.5531915
0.6808511	0.6750000	0.5581395	0.7674419	0.5434783
0.6346154	0.6346154	0.7894737	0.8157895	0.8157895
0.8717949	1.0000000			
0.6818182	0.6818182	0.6666667	0.7333333	0.7111111
0.6363636	0.6545455	0.7169811	0.6727273	0.6666667
0.6792453	0.5952381	0.6470588	0.5111111	0.5192308
0.6976744	0.5957447	0.6739130	0.7857143	0.5800000
0.5094340	0.5660377	0.6200000	0.6382979	0.7500000
0.7500000	0.7391304	0.7500000	0.7111111	0.6136364
0.7173913	0.7111111	0.6222222	0.5813953	0.7954545
0.7111111	0.7209302	0.7954545	0.5853659	0.6136364
0.6521739	0.4883721	0.6382979	0.6666667	0.7209302
0.6428571	0.6818182	0.7272727	0.7111111	0.5476190
0.5000000	0.5365854	0.7142857	0.5121951	0.6600000
0.6600000	0.6600000	0.5961538	0.6470588	0.6400000
0.5686275	0.6666667	0.7234043	0.7021277	0.6808511
0.7234043	0.6250000	0.6274510	0.3695652	0.5882353
0.5818182	0.5000000	0.5178571	0.5192308	0.6923077
0.4901961	0.5200000	0.4629630	0.5208333	0.3750000
0.3333333	0.3043478	0.5652174	0.5000000	0.4893617
0.4800000	0.4893617	0.4897959	0.5000000	0.6326531
0.5882353	0.5686275	0.5200000	0.5833333	0.5106383
0.6666667	0.5111111	0.5438596	0.5689655	0.5769231
0.4561404	0.4821429	0.6226415	0.3725490	0.7441860
0.7391304	0.6428571	0.6956522	0.7291667	0.6976744
0.6590909	0.6279070	0.7555556	0.7619048	0.6190476
0.5000000	0.5416667	0.5686275	0.5769231	0.6000000
0.6851852	0.6481481	0.7727273	0.5000000	0.5714286
0.6888889	0.6444444	0.6792453	0.6222222	0.7111111
0.5961538	0.6511628	0.6904762	0.7021277	0.7209302

0.5714286	0.5714286	0.5434783	0.5000000	0.5000000
0.5510204	0.5833333	1.0000000		
0.6500000	0.7368421	0.7631579	0.6666667	0.6829268
0.6000000	0.5090909	0.5370370	0.5000000	0.5185185
0.5283019	0.6857143	0.5833333	0.6216216	0.4791667
0.6250000	0.5952381	0.6829268	0.7179487	0.6136364
0.4693878	0.4423077	0.4600000	0.5000000	0.7250000
0.7250000	0.7142857	0.7250000	0.6829268	0.7027027
0.7317073	0.7250000	0.5853659	0.7647059	0.7317073
0.7250000	0.6923077	0.7317073	0.6285714	0.6153846
0.6585366	0.6000000	0.6428571	0.6315789	0.7368421
0.7428571	0.6923077	0.6585366	0.6829268	0.5405405
0.5294118	0.5277778	0.6410256	0.5428571	0.5957447
0.5957447	0.5957447	0.5306122	0.6170213	0.6086957
0.5319149	0.4909091	0.5208333	0.5000000	0.5106383
0.5208333	0.5555556	0.5000000	0.4102564	0.4313725
0.4107143	0.3818182	0.3750000	0.3921569	0.5384615
0.3600000	0.3877551	0.3396226	0.5476190	0.3809524
0.3684211	0.3333333	0.5476190	0.4888889	0.4651163
0.4666667	0.4651163	0.4772727	0.4883721	0.5000000
0.4600000	0.4693878	0.4468085	0.5813953	0.4883721
0.6750000	0.5789474	0.4285714	0.4310345	0.4509804
0.3392857	0.3392857	0.5294118	0.3191489	0.6750000
0.7142857	0.6944444	0.7073171	0.7045455	0.6250000
0.6666667	0.5897436	0.7750000	0.6923077	0.6216216
0.5250000	0.5348837	0.5652174	0.5416667	0.5652174
0.5370370	0.5576923	0.7500000	0.4038462	0.4680851
0.5813953	0.6923077	0.5576923	0.6250000	0.6428571
0.5306122	0.5750000	0.6578947	0.5000000	0.6923077
0.4285714	0.4285714	0.5365854	0.5238095	0.5238095
0.4468085	0.5000000	0.6744186	1.0000000	
0.5102041	0.5744681	0.5306122	0.5600000	0.5400000
0.4693878	0.6545455	0.6851852	0.6727273	0.6981132
0.7115385	0.3958333	0.6470588	0.4782609	0.4905660
0.5208333	0.4423077	0.5400000	0.5625000	0.5192308
0.6666667	0.8043478	0.7608696	0.7906977	0.5400000
0.5714286	0.5686275	0.5714286	0.5400000	0.5434783
0.5800000	0.5400000	0.4600000	0.4468085	0.5490196
0.5400000	0.5416667	0.5192308	0.3829787	0.5434783
0.5200000	0.4222222	0.6041667	0.5555556	0.5416667
0.3800000	0.4230769	0.5833333	0.6382979	0.4130435
0.3333333	0.3695652	0.5652174	0.3777778	0.5961538
0.5961538	0.5961538	0.5961538	0.6470588	0.6078431
0.5384615	0.6363636	0.6200000	0.6326531	0.6458333
0.6530612	0.5000000	0.8043478	0.5000000	0.6200000
0.6730769	0.6800000	0.6346154	0.6122449	0.7254902
0.6521739	0.6170213	0.5800000	0.4313725	0.4042553
0.3953488	0.3953488	0.7804878	0.7045455	0.7073171
0.6818182	0.7073171	0.7380952	0.7317073	0.7391304
0.8000000	0.7777778	0.7674419	0.5200000	0.4200000

0.5957447	0.4468085	0.6923077	0.6545455	0.6734694
0.5370370	0.5660377	0.7200000	0.4000000	0.5000000
0.5384615	0.5333333	0.6041667	0.5660377	0.6222222
0.5208333	0.5555556	0.5800000	0.5102041	0.5454545
0.4375000	0.5416667	0.4814815	0.4642857	0.5094340
0.6250000	0.6181818	0.5600000	0.5283019	0.6739130
0.5200000	0.5416667	0.6481481	0.5208333	0.5714286
0.6274510	0.5777778	0.5106383	0.6666667	0.5744681
0.6296296	0.6296296	0.6904762	0.7142857	0.7142857
0.8095238	0.8333333	0.5686275	0.5000000	1.0000000
0.5319149	0.6000000	0.5531915	0.5833333	0.5625000
0.4893617	0.6481481	0.6792453	0.6666667	0.6923077
0.7058824	0.4130435	0.6734694	0.5000000	0.4807692
0.5434783	0.4600000	0.5625000	0.5744681	0.5098039
0.6956522	0.8000000	0.7555556	0.8292683	0.5625000
0.5957447	0.5918367	0.5625000	0.5625000	0.5681818
0.5714286	0.5625000	0.4791667	0.4666667	0.5400000
0.5625000	0.5652174	0.5400000	0.4000000	0.5681818
0.5416667	0.4418605	0.5957447	0.5813953	0.5652174
0.3958333	0.4400000	0.6086957	0.6666667	0.4318182
0.3409091	0.3863636	0.5909091	0.3953488	0.6200000
0.6200000	0.6200000	0.6200000	0.6734694	0.6326531
0.5000000	0.6296296	0.6458333	0.6595745	0.6739130
0.6808511	0.5200000	0.8000000	0.5250000	0.6458333
0.6666667	0.6734694	0.6274510	0.6041667	0.7200000
0.6444444	0.6086957	0.5714286	0.4489796	0.4222222
0.4146341	0.4146341	0.7750000	0.7380952	0.7435897
0.7142857	0.7435897	0.7750000	0.7692308	0.7727273
0.8372093	0.7727273	0.7619048	0.5102041	0.4081633
0.5869565	0.4666667	0.6538462	0.6481481	0.6666667
0.5283019	0.5576923	0.7142857	0.3877551	0.5208333
0.5600000	0.5581395	0.6304348	0.5882353	0.6511628
0.5434783	0.5813953	0.5714286	0.5319149	0.5714286
0.4565217	0.5000000	0.4716981	0.4545455	0.4716981
0.6181818	0.6415094	0.5510204	0.4905660	0.7045455
0.5416667	0.5652174	0.6730769	0.5434783	0.5625000
0.6530612	0.6046512	0.5333333	0.6956522	0.5652174
0.6226415	0.6226415	0.7250000	0.7500000	0.7500000
0.8500000	0.8750000	0.5600000	0.4893617	0.9500000
1.0000000				
0.7380952	0.7804878	0.7619048	0.7906977	0.8095238
0.6136364	0.6071429	0.6363636	0.6250000	0.6181818
0.6296296	0.6097561	0.6938776	0.5581395	0.5600000
0.6744186	0.6086957	0.8095238	0.8048780	0.5918367
0.5490196	0.5471698	0.5384615	0.6170213	0.8536585
0.8095238	0.8809524	0.8095238	0.8095238	0.6279070
0.9024390	0.8095238	0.6363636	0.5952381	0.8571429
0.8095238	0.7804878	0.8571429	0.6000000	0.6279070
0.7045455	0.5000000	0.5833333	0.7250000	0.7380952
0.6585366	0.6976744	0.8292683	0.8095238	0.4883721

0.4750000	0.4761905	0.6511628	0.5250000	0.7446809
0.7446809	0.7446809	0.6734694	0.6938776	0.7608696
0.6122449	0.5892857	0.6666667	0.6808511	0.6956522
0.7021277	0.6739130	0.6078431	0.3777778	0.5686275
0.5636364	0.5090909	0.5000000	0.4716981	0.6415094
0.5000000	0.4705882	0.4716981	0.5319149	0.5116279
0.3111111	0.3111111	0.6000000	0.5416667	0.5333333
0.5208333	0.5333333	0.5652174	0.5555556	0.6122449
0.5686275	0.5800000	0.5000000	0.5957447	0.4893617
0.8500000	0.5952381	0.5263158	0.5517241	0.5576923
0.4137931	0.4385965	0.6346154	0.4081633	0.7619048
0.7954545	0.7000000	0.7906977	0.7826087	0.6363636
0.6363636	0.6829268	0.8571429	0.7380952	0.6341463
0.5111111	0.5531915	0.6458333	0.6200000	0.6122449
0.6363636	0.6296296	0.8333333	0.4545455	0.5833333
0.6666667	0.7380952	0.6296296	0.6000000	0.8095238
0.6400000	0.6279070	0.6666667	0.5800000	0.8250000
0.5535714	0.5535714	0.5217391	0.5106383	0.5106383
0.5306122	0.5510204	0.7555556	0.7317073	0.5800000
0.5714286	1.0000000	0.5454545	0.6190476	0.5681818
0.6000000	0.6136364	0.5000000	0.5740741	0.6037736
0.5925926	0.6153846	0.6274510	0.4523810	0.6250000
0.5897436	0.5208333	0.5952381	0.4680851	0.5777778
0.6046512	0.5531915	0.7619048	0.7500000	0.7045455
0.7750000	0.5777778	0.6136364	0.6086957	0.6136364
0.6136364	0.6250000	0.6222222	0.5777778	0.5227273
0.5500000	0.5869565	0.6136364	0.5813953	0.5531915
0.4750000	0.5853659	0.5555556	0.4871795	0.6511628
0.6410256	0.5813953	0.4651163	0.4782609	0.5909091
0.6511628	0.5128205	0.4210526	0.4250000	0.6097561
0.4736842	0.6739130	0.6382979	0.6382979	0.6382979
0.6595745	0.6521739	0.5102041	0.5555556	0.6304348
0.6444444	0.6590909	0.6666667	0.5652174	0.7111111
0.5405405	0.6304348	0.5576923	0.5918367	0.5490196
0.5531915	0.6400000	0.5555556	0.5217391	0.4897959
0.4565217	0.3953488	0.4594595	0.4594595	0.8611111
0.8157895	0.8285714	0.7894737	0.8285714	0.8611111
0.8571429	0.6818182	0.7441860	0.7209302	0.7500000
0.4893617	0.3829787	0.6829268	0.5121951	0.6078431
0.5740741	0.5833333	0.4528302	0.5098039	0.6326531
0.3617021	0.5333333	0.5744681	0.6153846	0.6363636
0.5714286	0.6341463	0.5952381	0.6000000	0.6222222
0.5813953	0.6756757	0.4651163	0.4782609	0.5102041
0.4901961	0.5416667	0.5740741	0.5961538	0.6000000
0.5000000	0.6511628	0.5555556	0.5813953	0.5961538
0.5952381	0.6136364	0.6382979	0.6250000	0.5476190
0.6818182	0.5813953	0.5471698	0.5471698	0.7105263
0.8333333	0.8333333	0.7500000	0.7750000	0.5416667
0.5714286	0.8048780	0.8000000	0.6222222	1.0000000

0.5454545	0.6190476	0.5681818	0.6000000	0.6136364
0.5000000	0.5740741	0.6037736	0.5925926	0.6153846
0.6274510	0.4523810	0.6250000	0.5897436	0.5208333
0.5952381	0.4680851	0.5777778	0.5909091	0.5531915
0.7619048	0.7500000	0.7045455	0.7750000	0.5777778
0.6136364	0.6086957	0.5777778	0.6136364	0.6250000
0.5869565	0.5777778	0.5227273	0.5500000	0.5531915
0.6136364	0.5813953	0.5531915	0.4750000	0.5853659
0.5555556	0.4871795	0.6136364	0.6410256	0.5813953
0.4651163	0.4782609	0.5909091	0.6511628	0.5128205
0.4102564	0.4250000	0.6097561	0.4736842	0.6739130
0.6382979	0.6382979	0.6739130	0.6956522	0.6521739
0.5102041	0.5555556	0.6304348	0.6444444	0.6590909
0.6666667	0.5652174	0.7111111	0.5833333	0.6304348
0.5882353	0.6250000	0.5800000	0.5531915	0.6734694
0.5555556	0.5217391	0.4897959	0.4888889	0.4285714
0.4594595	0.4594595	0.8611111	0.8648649	0.8823529
0.8378378	0.8823529	0.9142857	0.9117647	0.6818182
0.7857143	0.7209302	0.7500000	0.4893617	0.3829787
0.6428571	0.5121951	0.6078431	0.5740741	0.5833333
0.4807692	0.5098039	0.6326531	0.3333333	0.5333333
0.5744681	0.6153846	0.6511628	0.5714286	0.6750000
0.5952381	0.6410256	0.5869565	0.5813953	0.6756757
0.4651163	0.4782609	0.5102041	0.4901961	0.5102041
0.6037736	0.5961538	0.5652174	0.4705882	0.6511628
0.5555556	0.5813953	0.5961538	0.5952381	0.5777778
0.6382979	0.6250000	0.5476190	0.6818182	0.5454545
0.5471698	0.5471698	0.7105263	0.8857143	0.8857143
0.7948718	0.8205128	0.5102041	0.5348837	0.8048780
0.8461538	0.5869565	0.9428571	1.0000000	
0.5531915	0.6222222	0.5744681	0.6041667	0.6170213
0.5106383	0.6666667	0.6981132	0.6851852	0.7115385
0.7254902	0.4042553	0.6600000	0.5227273	0.5294118
0.6000000	0.4509804	0.5833333	0.6086957	0.5918367
0.6808511	0.7826087	0.7777778	0.8095238	0.5833333
0.6170213	0.6122449	0.6170213	0.6170213	0.6279070
0.6250000	0.5833333	0.5319149	0.5227273	0.5918367
0.6170213	0.5869565	0.5600000	0.4545455	0.5555556
0.5625000	0.4318182	0.6170213	0.6428571	0.5869565
0.4468085	0.4897959	0.6304348	0.6888889	0.4883721
0.4047619	0.4090909	0.6511628	0.4523810	0.6734694
0.6400000	0.6400000	0.6400000	0.6600000	0.6530612
0.5490196	0.6481481	0.6666667	0.6808511	0.6956522
0.7021277	0.5714286	0.8222222	0.5121951	0.7021277
0.6538462	0.6938776	0.6470588	0.6595745	0.6730769
0.6304348	0.5957447	0.5918367	0.4400000	0.4130435
0.4047619	0.4047619	0.8000000	0.6818182	0.6829268
0.6590909	0.6829268	0.7142857	0.7073171	0.7954545
0.8181818	0.7954545	0.7857143	0.5306122	0.4285714
0.6818182	0.4888889	0.7058824	0.6666667	0.6530612

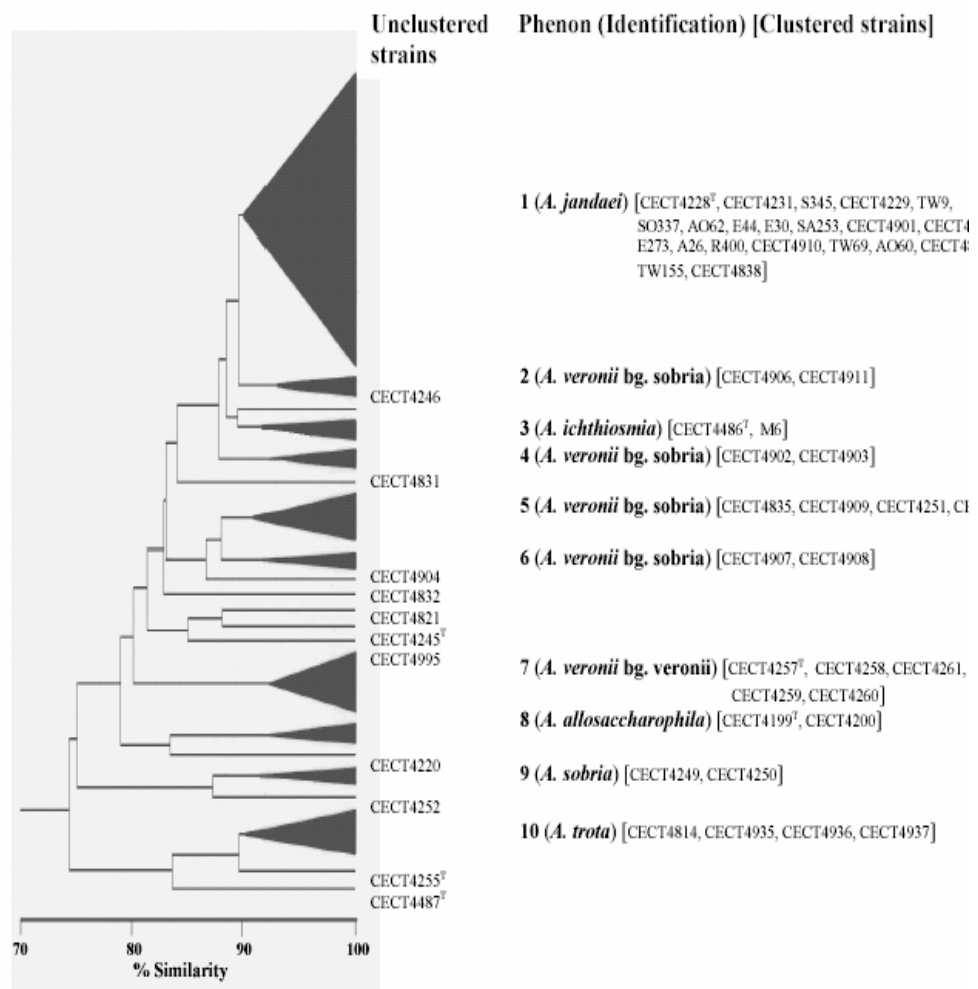
0.5769231	0.6078431	0.7346939	0.4680851	0.5416667
0.5800000	0.5813953	0.6382979	0.6400000	0.6363636
0.6363636	0.6046512	0.6250000	0.5869565	0.6341463
0.4782609	0.4897959	0.5490196	0.5283019	0.5490196
0.6071429	0.6603774	0.6041667	0.5384615	0.7272727
0.5957447	0.5869565	0.6923077	0.5652174	0.6170213
0.6400000	0.6279070	0.5217391	0.7555556	0.5869565
0.6415094	0.6415094	0.7073171	0.6904762	0.6904762
0.7857143	0.8536585	0.6122449	0.5777778	0.8372093
0.8333333	0.6250000	0.8250000	0.7804878	1.0000000
0.5652174	0.6363636	0.5869565	0.6170213	0.5957447
0.5217391	0.6481481	0.6792453	0.6666667	0.6923077
0.7058824	0.4444444	0.6734694	0.5348837	0.4807692
0.5777778	0.4897959	0.5957447	0.6222222	0.5400000
0.6956522	0.7608696	0.7555556	0.8750000	0.5957447
0.6304348	0.6250000	0.6304348	0.5957447	0.6046512
0.6382979	0.5957447	0.5106383	0.5000000	0.6041667
0.5957447	0.6000000	0.5714286	0.4318182	0.6046512
0.5744681	0.4761905	0.6304348	0.6190476	0.6000000
0.4255319	0.4693878	0.6444444	0.7045455	0.4651163
0.3809524	0.4186047	0.6279070	0.4285714	0.6530612
0.6530612	0.6530612	0.6200000	0.6734694	0.6666667
0.5000000	0.6296296	0.6458333	0.6595745	0.6739130
0.6808511	0.5510204	0.8000000	0.5250000	0.6808511
0.6346154	0.6734694	0.5961538	0.6041667	0.6862745
0.6086957	0.5744681	0.5400000	0.4489796	0.4222222
0.4500000	0.4500000	0.8205128	0.6976744	0.7000000
0.6744186	0.7000000	0.7317073	0.7250000	0.7727273
0.7954545	0.7727273	0.7619048	0.5102041	0.4375000
0.6590909	0.4666667	0.6538462	0.6481481	0.6666667
0.5283019	0.5576923	0.7142857	0.4468085	0.5531915
0.5918367	0.5581395	0.6521739	0.6530612	0.6511628
0.6136364	0.5813953	0.6382979	0.5652174	0.6097561
0.4888889	0.5000000	0.5294118	0.5094340	0.5294118
0.6181818	0.6415094	0.6170213	0.5490196	0.7045455
0.5744681	0.6000000	0.6730769	0.5434783	0.5957447
0.6530612	0.6428571	0.5681818	0.7333333	0.6000000
0.6226415	0.6226415	0.7250000	0.7073171	0.7073171
0.7619048	0.8292683	0.6250000	0.5909091	0.8571429
0.8536585	0.6382979	0.8461538	0.8000000	0.9250000
1.0000000				
0.6000000	0.6744186	0.6222222	0.6521739	0.6304348
0.5217391	0.6181818	0.6481481	0.6363636	0.6603774
0.6730769	0.4444444	0.6734694	0.5348837	0.5098039
0.6136364	0.4897959	0.6304348	0.6590909	0.5400000
0.7333333	0.7234043	0.6808511	0.7857143	0.6304348
0.6666667	0.6595745	0.6666667	0.6304348	0.6428571
0.6739130	0.6304348	0.5434783	0.5348837	0.6382979
0.6304348	0.6363636	0.6041667	0.4651163	0.6046512
0.6086957	0.4761905	0.6666667	0.6585366	0.6363636



0.4565217	0.5000000	0.6444444	0.7045455	0.5000000
0.4146341	0.3863636	0.6279070	0.4634146	0.6875000
0.6875000	0.6875000	0.6875000	0.7446809	0.7021277
0.5600000	0.6000000	0.6458333	0.6595745	0.6739130
0.6808511	0.5833333	0.7608696	0.5641026	0.6458333
0.6346154	0.6078431	0.5961538	0.5714286	0.7200000
0.5416667	0.5102041	0.5098039	0.5106383	0.4883721
0.4500000	0.4500000	0.8684211	0.7804878	0.7894737
0.7560976	0.7894737	0.8205128	0.8157895	0.7333333
0.7555556	0.6956522	0.6818182	0.5744681	0.4375000
0.6976744	0.5000000	0.6538462	0.6181818	0.6000000
0.5000000	0.5283019	0.6800000	0.3600000	0.5869565
0.6250000	0.5952381	0.7045455	0.6200000	0.6511628
0.6136364	0.6585366	0.6739130	0.6000000	0.6500000
0.5227273	0.5652174	0.5294118	0.5094340	0.5600000
0.6481481	0.6415094	0.6521739	0.5490196	0.7045455
0.5744681	0.6363636	0.6415094	0.5777778	0.6304348
0.6530612	0.6046512	0.5681818	0.6956522	0.6363636
0.5925926	0.5925926	0.6829268	0.7948718	0.7948718
0.7619048	0.7857143	0.5918367	0.5909091	0.8571429
0.8536585	0.6739130	0.8947368	0.8947368	0.8333333
0.8536585	1.0000000			
0.5000000	0.5652174	0.5208333	0.5833333	0.5957447
0.5555556	0.6181818	0.6481481	0.6363636	0.6603774
0.6730769	0.4772727	0.6400000	0.5714286	0.5098039
0.5434783	0.4313725	0.5306122	0.5531915	0.5400000
0.6956522	0.7608696	0.7555556	0.8292683	0.5957447
0.5957447	0.6250000	0.5957447	0.5957447	0.5681818
0.6041667	0.5625000	0.5434783	0.5000000	0.5714286
0.5957447	0.5652174	0.5714286	0.5000000	0.5333333
0.5744681	0.4761905	0.5957447	0.6585366	0.5319149
0.4888889	0.5000000	0.6086957	0.6304348	0.5000000
0.4146341	0.4523810	0.6666667	0.5000000	0.6875000
0.6530612	0.6530612	0.6875000	0.6734694	0.6666667
0.5294118	0.6000000	0.6808511	0.6956522	0.7111111
0.7173913	0.5833333	0.7608696	0.5250000	0.7173913
0.6666667	0.7083333	0.6600000	0.6041667	0.6862745
0.6444444	0.6086957	0.5714286	0.4489796	0.3913043
0.4146341	0.4146341	0.8205128	0.7804878	0.7894737
0.7560976	0.7894737	0.8205128	0.8157895	0.7333333
0.8372093	0.7727273	0.7619048	0.4800000	0.3800000
0.6590909	0.5000000	0.6862745	0.6481481	0.6666667
0.5576923	0.5882353	0.6800000	0.4166667	0.5531915
0.5918367	0.5952381	0.5957447	0.6200000	0.6904762
0.5777778	0.6585366	0.6041667	0.6000000	0.6923077
0.4255319	0.4693878	0.5000000	0.4814815	0.5294118
0.6181818	0.6111111	0.5833333	0.5192308	0.7045455
0.6086957	0.5652174	0.6415094	0.6136364	0.6304348
0.6200000	0.6829268	0.5333333	0.7333333	0.5652174
0.6226415	0.6226415	0.6829268	0.7500000	0.7500000

0.8048780	0.8292683	0.6250000	0.5217391	0.8139535
0.8095238	0.6382979	0.8461538	0.8461538	0.8333333
0.8536585	0.8095238	1.0000000		

## 8. Dendrograma obtenido por análisis UPGMA según coeficiente $S_{SM}$ para agrupamiento de cepas del estudio de hibridación DNA-DNA.



Dendrograma simplificado basado en el coeficiente  $S_{SM}$  y el algoritmo de agrupamiento UPGMA para cepas de estudio de hibridación DNA-DNA. Muestra la relación entre los 10 fenons definidos a un nivel del 90% de similitud (S). T, cepa tipo

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## Bibliografía

### A

1. Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Kroske-Bystrom, S., Malekzadeh, T. y Janda, J.M. (1992). "Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory". *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 1262-1266.
2. Adams, D., Atkinson, H. M. y Woods, W.H. (1983): "*Aeromonas hydrophila* typing scheme based on patterns of agglutination with erythrocytes and yeast cells". *Journal of Clinical Microbiology*, **17**, 422-427.
3. Aikten, R.S., Barling, B. y Miles, A.A. (1936). "A case of botulism". *Lancet*, **2**, 780.
4. Alderman, D.J. (1988): "Fisheries chemotherapy": A review. En *Recent Advances in Aquaculture*. Muir, J.F. & Roberts, R.J. (eds.). pág. 1-61; London.
5. Ali, A. Carnahan, A.M, Altwegg. M., Lüthy-Hottenstein.J.y Joseph.S.W. (1996). "*Aeromonas bestiarum* sp.nov. (Formerly genospecies DNA group 2 *A.hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Medical Microbiology Letters*; **5**: 156-165
6. Alsever, J.B. y Ainslie, R.B. (1941): "A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service". N.Y. State. *Journal of Medicine*, **41**, 126-131.
7. Altwegg. M., Steigerwalt, A. G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottenstein, J. y Brenner, D. J. (1990): "Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans". *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 258-264.
8. Altwegg, M., Reeves, M.W., Altwegg-Bissig, R. y Brenner, D.J. (1991): "Multilocus enzyme analysis of the genus *Aeromonas* and its use for

- species identification". *Zentralblatt für Bakteriologie* **275**, 28-45.
9. Altwegg, M., (1993a). "A polyphasic approach to the classification and identification of *Aeromonas* strains". *Med. Microbiol.Lett.* **2**: 200-205.
  10. Altwegg, M., (1993b). "*Aeromonas* and *Plesiomonas*". **Cap 32**. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>th</sup> Edition. ASM Press. p.507-516.
  11. Allan, B. J. y Stevenson, R.M.W. (1981): "Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish". *Canadian Journal of Microbiology*, **27**, 1114-1122.
  12. Allen, D. A., Austin, B. y Colwell, R. R. (1983a): "Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery". *Journal of General Microbiology*, **129**, 2043-2062.
  13. Allen, D. A., Austin, B. y Colwell, R. R. (1983b): "*Aeromonas media*. A new species isolated from river water". *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**, 599-604.
  14. Angen Ø., Mutters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E. y Bisgaard, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen.nov., comb.nov., *Mannheimia granulomatis* comb.nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigea* sp.nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**, 67-86.
  15. Amaro, C., Biosca, E.G., Esteve, C., Fouz, B. y Toranzo, A.E. (1992): "Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities". *Diseases of Acuatic Organisms*, **13**, 29-35.
  16. Andrus, C.R. y Payne, S. N. (1983): "Abstracts 83th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.", D-13, pág. 61
  17. Andrus, C.R., Walter, M.A., Crosa, J.H. y Payne, S.M. (1983): "Synthesis of siderofore by pathogenic *Vibrio species*". *Current Microbiology*, **9**, 209-214.

18. Aoki, T. y Holland, B.I. (1985): "The outer membrane proteins of the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Edwardsiella tarda*". *FEMS Microbiology Letters* **27**, 299-305.
19. -A.W.A.-W.P.C.F. (1989): En "Standard methods for the examination of water and wastewater". 17ª edición. Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. y Trussel, R.R. (eds.). Washington.
20. API 20E. Analytical profile index (1989): "API system". Montalieu Vercieu.
21. Arnow, L.E. (1937): "Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures". *Journal of Biology and Chemistry*, **118**, 531-541.
22. Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. y Sakaguchi, G. (1984): "Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin". *Infection and Immunity*, **46**, 122-127.
23. Ash, C., Martinez-Murcia, A.J. y Collins, M. D. (1993a). "Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test". *FEMS Microbiol Lett* **108**, 151-156.
24. Ash, C., Martinez-Murcia, A.J. y Collins, M. D. (1993b). "Molecular identification of *Aeromonas sobria* by using a polymerase chain reaction-probe test". *Med Microbiol Lett* **2**, 80-86.
25. Atkinson, H.M. y Trust, T.J. (1980): "Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*". *Infection and Immunity*, **27**, 938-946.
26. Austin, B. (1985a): "Chemotherapy of bacterial fish diseases". En *Fish and Shellfish Pathology*. Ellis, A.E. (ed.). pág. 19-26. Academic Press. London.
27. Austin, B. (1985b): "Antibiotic pollution from fish farms: effects on aquatic microflora". *Microbiological Sciences*, **2**, 113-117.
28. Austin, B. y Austin, D. A. (1987): En "Bacterial Fish Pathogens. Disease in Farmed and Wild Fish". L. M. Laird (ed.). Ellis Horwood Ltd. John

Wiley & Sons. New York.

29. Austin, D. A., McIntosh, D. y Austin, B. (1989): "Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov." *Systematic and Applied Microbiology*, **11**, 277-290.
30. Austin, B y Adams, C. (1996). "Fish pathogens", Cap 8. p.198- 230. En "The genus *Aeromonas*". Austin, B., Altwegg, M., Gosling.P.J. & Joseph. *S Ellis Horwood Ltd. John Wiley & Sons. New York.*
31. Austin, B., Altwegg, M., Gosling.P.J. y Joseph. S. (1996): En "The genus *Aeromonas*". Ellis Horwood Ltd. John Wiley & Sons. New York.
32. Aznar, R. (1991): "Caracterización fenotípica y genotípica de cepas ambientales de *Pseudomonas*". Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia. España.

## B

33. Barghouthi, S., Young, R., Olson, M.O.J., Arceneaux, J.E.L., Clem, L.W. y Byers, B.R: (1989): "Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*". *Journal of Bacteriology*, **171**, 1811-1816.
34. Barja, J. L. y Toranzo, A. E. (1988): "Enfermedades bacterianas de peces". En: *Patología en acuicultura*. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (eds.). pág. 475-550. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (CAYCIT). Madrid.
35. Baumann, P., Baumann, L. y Mandel, L. (1971): "Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*". *Journal of Bacteriology*, **107**, 268-294.
36. Baumann, P., Furniss, A. L. y Lee, J. V. (1984): *Genus I. Vibrio* Pacini 1854, 411<sup>AL</sup>. En "Bergey's manual of systematic bacteriology. Section 5. Vol. I". Krieg, N. R. y Holt, J. G (eds.). IX edition. pág. 518-538. Williams & Wilkins. Baltimore.
37. Baumann, P. y Schubert, R.H.W. (1984): FAMILY II. **Vibrionaceae**



- VERON 1965, 5245<sup>AL</sup>. In "Bergey's manual of systematic bacteriology. Section 5. Vol. I". Krieg, N. R y Holt, J. G. (eds.). IX edition. pág. 516-517. Williams & Wilkins. Baltimore.
38. Baxa, D.V., Groff, J.M., Wishkovsky, A. y Hedrick, R.P. (1990): "Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with *Edwardsiella ictaluri*". *Diseases of Aquatic Organisms* **8**, 113-117.
39. Beijerinck, M.W. (1900): "Schwefelwasserstoffbildung in den stadtgräben und aufstellung der *Aerobacter*". *Zentralblatt Bakteriologie*, II Abt., **7**, 193-206.
40. Belland y Trust (1988). DNA: DNA reassociation analysis of *Aeromonas salmonicida*. *J.Gen.Microbiol.* **134**, 307-315.
41. Bergey, D.H., Harrison F.C., Breed, R.S, Hammer, B.W y Hunton F.M (ed) 1923." *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*". Williams and Wilkins Co., Baltimore.
42. Bernheimer, A.W y Avigard, L.S. (1974): "Partial characterization of aerolysin a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*". *Infection and Immunity*, **9**, 1016-1021.
43. Bernheimer, A.W., Avigard, L.S. y Avigard, G. (1975): "Interaction between aerolysin, erythrocytes and erythrocyte membrane". *Infection and Immunity*, **11**, 1312-1319.
44. Bernoth, E.-M. (1990): "Marketing authorization of fish drugs-current status and future intentions". *Journal of Veterinary Medicine B*, **37**, 401-406.
45. Biosca, E. G., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. y Garay, E. (1991): "First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla Anguilla* L". *Journal of Fish Diseases*, **14**, 103-109.
46. Borrell, N., Figueras, M.J. y Guarro, J. (1998). "Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources". *Canadian Journal of Microbiology*. **44**, 7-12.
47. Boussaid, A., Baleux, B., Hassani, L. y Lesne, J. (1991): "*Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco,

- and relation to fecal- pollution and climatic factors”. *Microbial Ecology*. 21, 11-20.
48. Bradford, M.M. (1976): “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
49. Bravo L., Monte R.j., Alfonso. V., Cabrera.N., Gómez., M, Hernández. R.y García.B. (1995).”Nuevas especies de *Aeromonas* aisladas en Cuba”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **47** (3): 215-216.
50. Bravo L., San German Suarez. S., Monte B. R., Castillo A. A., R.y García.B. (1995). “Marcadores fenotipicos en cepas de *Aeromonas* aisladas an Cuba, en niños con EDA”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **47** (2): 114-117.
51. Breed, R.S., Murray. E.D.G y Hitches A.P (ed) 1948. “Bergey`s manual of determinative bacteriology” 7ª ed Williams and Wilkins. Co. Baltimore.
52. Brenden, R. y Janda, J. M. (1987): “Detection, quantitation and stability of the haemolysin of *Aeromonas* spp”. *Journal of Medical Microbiology*, **24**, 247-251.
53. Brenner, D. J. (1984): Family I. **Enterobacteriaceae** Rahn 1937, Nom. fam. cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958, 73; Ewing, Farmer, and Brenner 1980, 674; Judicial Commision 1981, 104. En “Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Section 5. Vol. I”. Krieg, N. R. y Holt, J. G. (eds.). IX edition. pág. 408-516. Williams & Wilkins. Baltimore.
54. Brosius, J., J.L. Palmer; J.P.Kennedy, y H.F.Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from escherichia coli. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **75**: 4801-4805.
55. Bryant, T. N., Lee, J. V., West, P. A. y Colwell, R. R. (1986). “Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera”. *Journal of Applied Bacteriology*. **61**, 437-467.
56. Buck, J. D. (1982): “Nonstainig (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria”. *Applied and Environmental*

*Microbiology*, **44**, 992-993.

57. Bullen, J.J., Rogers, H.J. y Griffiths, E. (1978): "Role of iron in bacterial infection". *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **80**, 1-35.
58. Burke, V., Cooper, M. y Robinson, J. (1986): "Haemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. related to species and source of strains". *Australian Journal of Experimental Biological and Medical Science*, **61**, 563-570.

## C

59. Cahill, M.M. (1990): "Bacterial flora of fishes: a review". *Microbial Ecology*, **19**, 21-41.
60. Cahill, M.M. y MacRae, I.C. (1992): "Characteristics of O/129-sensitive motile *Aeromonas* strains isolated from freshwater on starch-ampicillin agar". *Microbial Ecology*, **24**, 215-226.
61. Cailleaux, V., Dupont, M.-J., Hory, B., Amsallem, D. y Michel-Briand, Y. (1993): "Why did infection with *Aeromonas hydrophila* occur when water contains so many other microorganisms?" *Clinical Infectious Diseases*, **16**, 174.
62. Carnahan, A. Fanning, G. R. y Joseph, S. W. (1991 a): "*Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens". *Journal of Clinical Microbiology*. **29**, 560-564.
63. Carnahan, A. M., Chakraborty, T., Fanning, G. R., Verma, D., Ali, A., Janda, J. M. y Joseph, S. W. (1991b): "*Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens". *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 1206-1210.
64. Carnahan, A.M., Behram, S. y Joseph, S.W. (1991c): "Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species". *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 2843-2849.
65. Carnahan, A.M. y Joseph, S.W. (1993): "Systematic assessment of

- geographically and clinically diverse *Aeromonads*". *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 72-84.
66. Carnahan, A.M. and Joseph, S.W. (1994): "The isolation, identification, and systematics of the motile species." *Annual Review of Fish diseases* .Vol 4.p 315-343.
67. Carnahan, A.M. y Altwegg, M. (1996). "Taxonomy". Cap.1 p.1-39. En "The genus *Aeromonas*". Austin, B., Altwegg, M., Gosling.P.J. & Joseph. S. *Chichester: Wiley*.
68. Caselitz, F.H. (1955). "Eine neue Bacterium der Gattung: *Vibrio Muller, Vibrio jamaicensis*". *Z. Tropenmed Parasitol*; **6**: 52-63.
69. Chakraborty, T., Montenegro, M.A., Sanyal, S.C., Helmuth, R., Bulling, E. y Timmis, K.N. (1984): "Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin". *Infection and Immunity*, **46**, 435-441.
70. Chomarat, M., Guerin-Faubleé, V., Kodjo, A., Breysee, F. y Flandrois, J.P (1998). "Molecular analysis of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* by pulsed-field gel electrophoresis". *Revue Méd. Vétérinaire* **149**, 3, 245-250.
71. Chart, H., Shaw, D.H., Ishiguro, E.E. y Trust, T.J. (1984): "Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide". *Journal of Bacteriology*. **158**, 16-22.
72. Chester, F.D. (1901). "A Manual of Determinative Bacteriology". *New York: MacMillan*, p. 235.
73. Chopra, A.K. y Houston, C.W. (1989): "Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*". *Canadian Journal of Microbiology*, **35**, 719-727.
74. Christensen, H., Angen Ø., Mutters, R., Olsen, J.E. y Bisgaard, M. (2000). DNA-DNA hybridization determined in microwells using covalent attachment of DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 1095-1102.
75. Colwell, R.R., MacDonell, M.T., y DeLey, J. (1986): "Proposal to

- recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **36**, 473-477.
76. Collins, C. H., Lyne, P. M. y Grange, J. M. (1989): En "Microbiological methods. Cap.20, *Vibrios, Aeromonas and Plesiomonas*" Butterworth & Co. (ed.).pág. 253-260. Londres.
77. Collins, M.D; Martinez-Murcia, A.J y CAI, J. (1993): "*Aeromonas enteropelógenes* and *Aeromonas ichtiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii* respectively, as revealed by small-subunit r RNA Sequence Analysis". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 855-856
78. Clewley JP. (1998) "A user guide to producing and interpreting tree diagrams in taxonomy and phylogenetics. Pat 1. Introduction and naming of parts. *Communicable Disease and Public Health*. **1**. 64-66.
79. Clewley JP. (1998) "A user guide to producing and interpreting tree diagrams in taxonomy and phylogenetics. Pat 2. The multiple alignment of DNA and protein sequences to determine their relationships". *Communicable Disease and Public Health*. **2**. 132-134.
80. Clewley JP. (1998) "A user guide to producing and interpreting tree diagrams in taxonomy and phylogenetics. Pat 3. Using restriction fragment length polymorphism patterns of bacterial genomes to draw trees". *Communicable Disease and Public Health*. **3**. 208-210.
81. Clewley JP. (1998) "A user guide to producing and interpreting tree diagrams in taxonomy and phylogenetics. Pat 4. Practice". *Communicable Disease and Public Health*. **4**. 285-287.
82. Crawford. I.P. (1954). "A new fermentative *Pseudomonas formicans* n.sp". *Journal of Bacteriology*. **68**: 734-738.
83. Crosa, J.H. (1989): "Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria". *Microbiological Reviews*, **53**, 517-530.

**D**

84. Dahle, H.K. (1971): "The purification and some properties of two *Aeromonas* proteinases". *Acta of Pathology and Microbiology of Scandinavia*, B **79**, 726-738.
85. Daily, O.P., Joseph, S.W., Coolbaugh, J.C., Walker, R.I., Merrell, B.R., Rollings, D.M., Seidler, R.J., Colwell, R.R. y Lissner, C.R. (1981): "Association of *Aeromonas sobria* with human infection". *Journal of Clinical Microbiology*, **13**, 769-777.
86. Degani, G. y Levanon, D. (1983): "The influence of low density on food adaptation, cannibalism and growth of eels (*Anguilla anguilla*, L.)". *Bamidgeh*, **35**, 53-60.
87. De Ley, J., H., Cattoir, y A. Reynaerts. (1970). "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturalization rates". *Eur. J. Biochem.* **12**: 133-142.
88. Del Corral, F., Shotts Jr., E.B. y Brown, J. (1990): "Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish". *Journal of Fish Diseases*, **13**, 255-268.
89. Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A., Beretta, M. y Peduzzi, R. (2000). "Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping". *Eur. Journal of Epidemiology*. **16**, 447-453.
90. Dice, L.R. (1945): "Measures of the amount of ecologic association between species". *Ecology*. **26**: 297-302.
91. Doestch, R. N. (1981): "Determinative methods of light microscopy". En *Manual of Methods for General Bacteriology*. Cap. III, Morphology. R. G. E. (de). pág. 26-27. ASM. Washington.
92. Donta, S.T. y Haddow, A.D. (1978): "Citotoxic activity of *Aeromonas hydrophila*". *Infection and Immunity*, **21**, 989-993.
93. Dooley, J.S.G. ., Lallier, R., Shaw, D.H. y Trust, T. J. (1985): "Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*". *Journal of Bacteriology*, **164**, 263-269.

94. Dooley, J.S.G. y Trust, T.J. (1988): "Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of surface array protein". *Journal of Bacteriology*, **170**, 499-506.
95. Dooley, J.S.G., Mc. Cubbin, W., Kay, C.M. y Trust, T.J. (1988): "Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain". *Journal of Bacteriology*, **170**, 2631-2638.
96. Doran, J.L., Bingle, W.H. y Page, W.J. (1987): "Role of calcium in assembly of the *Azotobacter vinelandii* surface array". *Journal General Microbiology*, **133**, 399-413.
97. Dorsch, M., Lane, D y Stackebrandt, E. (1992)" Towards a Phylogeny of the Genus *Vibrio* based on 16S rRNA Sequences". *International Journal of Systematic Bacteriology*.p. 58-63.
98. Dubey, R.S. y Sanyal, S.C. (1979): "Studies on the characterization and neutralization of *Aeromonas hydrophila* enterotoxin in the rabbit ileal loop model". *Journal of Medical Microbiology*. **12**, 354.
99. Duchesne, L.G.M., Lam, J.S., MacDonald, L.A., Whitfield, C. y Kropinski, A.M. (1988): "Effect of pH and acrylamide concentration on the separation of lipopolysaccharides in polyacrylamide gels". *Current Microbiology*, **16**, 191-194.
100. Duguid, J.P. (1959): "Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains". *Journal of General Microbiology*, **21**, 271-286.

## E

101. Eddy, B.P. y Carpenter, K.P. (1964): "Further studies on *Aeromonas* II. Taxonomy of *Aeromonas* and C27 strains". *Journal of Applied Bacteriology*, **27**, 96-109.
102. Eel d' yeu (Eds.) (1987): En "Aquaculture d'anguilles. Bio-Techniques". Port Joinville.

103. Emmerich, R. y Weibel, C. (1894): "Über eine durch baktereien erzeugte seuche unter den forellen". *Archives Hygiene*, **21**, 1-21.
104. Ernst, P. (1990): "Die frühjahrsseucher der frösche und ihre abhängigkeit von temperatur in flüssen". *Beitraege in Pathologie, Anatomie, Allergologie und Pathologie*, **8**, 203.
105. Esteve, C. y Amaro, C. (1991): "Siderophore production in *Aeromonas* spp. isolated from European eel, *Anguilla Anguilla* L." *Journal of Fish Diseases*, **14**, 423-427.
106. Esteve, C. y Garay, E. (1992): "Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* and *Aeromonadaceae* strains from water and fish. Proceedings of the Conference on Taxonomy and Automated Identification of Bacteria." Schindler, J. (de.). pág. 33-36. Praga.
107. Esteve, C. (1993a). "Bacterias patógenas de la Anguila europea *Anguilla Anguilla*, L. Taxonomía y factores relacionados con su virulencia". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España.
108. Esteve, C; Biosca, E. G y Amaro, C. (1993b). "Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water."
109. Esteve, C (1995a). "Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* isolated from fish and surrounding aquatic environment". *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 391-402.
110. Esteve, C., Gutiérrez, M.C y A.Ventosa. (1995b). "DNA relatedness among *A.allosacharophila* and DNA groups of genus *Aeromonas*". *Int. J. Syst. Bacteriol. Notes.* 390-391.
111. Esteve, C., Gutiérrez, M.C y A.Ventosa. (1995c). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int. J.Syst. Bacteriol* **45**, 462-466.
112. Esteve, C. (1997). "Is AFLP Finger printing a trae alternative to the DNA-DNA Pairing Method to Asses Genospecies in the Genus *Aeromonas*?" *Int. J.Syst. Bacteriol. Letters to the Editor*, 245-246.
113. Esteve, C., Valera L.V, Gutiérrez, M.C y A.Ventosa. (2002) "Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates



- from faeces, water and eels: emendation of *Aeromonas jandaei* (Carnahan et al. 1991)". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,
114. Evelyn, T. P. T. y McDermott, L. A. (1991): "Bacteriological studies of fresh-water fish and Isolation of aerobic bacteria from several species of Ontario fish." *Canadian Journal of Microbiology*, **7**, 375-382.
115. Evelyn, T.P.T. (1968): "Tissuel levels of chloramphenicol attained in sockeye (*Onchorynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon by feeding". *Bulletin of Off. International Epizooties*, **69**, 1453-1463.
116. Evenberg, D., vanBoxtel, R., Lugtenberg, B. y Schurer, F. (1982): "Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. I. Relationship between autoagglutination and the presence of a major cell envelope protein". *Biochimica and Biophysica Acta*, **648**, 241-248.
- F**
117. Fanning, G.R.; Hickman-Brenner, F. W., Farmer III, J.J. y Brenner, D. J. (1985): "DNA relatdeness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas*". *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington*, abstract C-116.
118. Farmer III, J. J. y Hickman-Brenner, F. W. (1992): "The genera *Vibrio* and *Photobacterium*". En *The Prokaryotes*. 2ª edición. Vol. III, Cap. 157. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.-H. (eds.). pág. 2953-3011. Springer-Verlag. Nueva York, Berlin, Heidelberg, Londres, Paris, Tokio, Hong-Kong, Barcelona y Budapest.
119. Farmer III, J. J., Arduino, M. I. y Hickman-Brenner, F. W. (1992): "The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*". En *The Prokaryotes*. 2ª edition. Vol. III. Cap. 158. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.-H. (eds.). pág. 3012-3045; Springer-Verlag. Nueva York, Berlin, Heidelberg, Londres, Paris, Tokio, Hong-Kong, Barcelona and Budapest.
120. Ferragut, C y Leclerc, H. (1976). Étude comparative des méthodes de détermination du Tm de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol* **127**, 223-235.
121. Figueras. M.J., Soler. L., Chacón. M.R., Guarro.J and Martinez-

- Murcia.A. J. (2000): "Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16s rDNA RFLP analysis". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**. 2069-2073.
- 122.Filip, C., Fletcher, G., Wulf, J.L. y Earhart, C.F. (1973): "Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent, sodium lauryl sarkosinate". *Journal of Bacteriology*, **115**, 717-722.
- 123.Finlay, B.B. y Falkow, S. (1989): "Common themes in microbial pathogenicity". *Microbiological Reviews*. **53**, 210-230.
- 124.Fluharty, D. M. y Packard, W. L. (1967): "Differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria without staining". *American Journal of Veterinary and Clinical Pathology*. **1**, 31-35.
- 125.Forrest, D. M. (1976): Section 2-Eel Culture. En "Eel Capture, Culture, Processing and Marketing". pág. 45-51. *Fishing News (Book) Ltd.*, Surrey.
126. Fox, G.E., Wisotzkey, J.D y Peter Jurtsheek, J.R (1992). "How Close is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient to Guarantee Species Identity" *International Journal of Systematic Bacteriology*. p. 166-170.
- 127.Fricker, D. R. (1987): "Serotyping of mesophilic *Aeromonas* spp. on the basis of lipopolysaccharide antigens". *Letters in Applied Microbiology*, **4**, 113-116.
- 128.Furniss, A. L., Lee, J. V. y Donovan, T. J. (1978): En "The *Vibrios*". *Public Health Laboratory Service Monograph Series* 11. H. M. S. O. Londres.

## G

- 129.Gault, J. (1986): "L'élevage de l'anguille". En *Aquaculture*. Vol. 2. Cap. VII. G. Barnabé (ed.). pág. 742-771. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris.

130. Gauthier, M. J., Aubert, J. y Aubert, M. (1982): "Numerical analysis of the heterotrophic bacterial flora from necroses of marine fish". *Revisite Internationale du Océanografic Médecine*, **66/67**, 3-32.
131. Geldreich, E. E. (1977): "Microbiology of water". *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **69**, 1222-1244.
132. Gierer, W., Rabsch, W. y Reissbrodt, R. (1992): "Siderophore pattern of fish-pathogenic *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. from the German baltic coast". *Journal of Fish Diseases*, **15**, 417-423.
133. Gillespie, N. C. (1981): "A numerical taxonomy study of *Pseudomonas-like* bacteria isolated from fish in Southeastern Queensland and their association with spoilage". *Journal of Applied Bacteriology*, **50**, 29-44.
134. Gold, W.L. y Salit, I.E. (1993): "*Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review". *Clinical Infectious Diseases*, **16**, 69-74.
135. Goodfellow, M. (1977): "Numerical taxonomy", En: *CRC Handbook of Microbiology*. vol 1. II edition Larkin, A.I. and Lechevalier, H.A. (ed.). Cleveland CRC Press.
136. Gordillo. M.E, Singh .Kavindra V y Murray. B.E. (1993). "Comparison of ribotyping and pulsed- field electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*". *Journal of Clinical Microbiology*. 1570-1574.
137. Goris, J., Suzuki, K. I., De Vos, P., Nakase, T. y Kesters, K. (1998). "Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method". *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 1-7.
138. Gousset, B. (1989): "The status of European eel (*Anguilla anguilla* L.) culture in Japan". En *Aquaculture, A Biotechnology in Progress*. N. de Paw, E. Jaspers, H. Ackefors y N. Wilkins (eds.), pág. 185-196. European Aquaculture Society. Bredene.

- 139.Griffiths, E. (1987): "The iron uptake systems of pathogenic bacteria". En *Iron and Infection*. JJ. Bullen & E. Griffiths (eds.) pág. 69-137. John Willey & Sons, Chichester.
- 140.Griffiths, S.G. y Lynch, W.H. (1990): "Characterization of *Aeromonas salmonicida* variants with altered cell surfaces and their use in studying surface protein assembly". *Archives of Microbiology*, **154**, 308-312.
- 141.Groberg, W. J., McCoy, R. H., Pilcher, K. S., y Fryer, J. L. (1978): "Relation of water temperature to infections of coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*), chinook salmon (*O. tshawytscha*), and steelhead trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*". *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. **35**, 1-7.
- 142.Grothues. D y Tümmler, B., (1991). "New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species". *Molecular Microbiology*. **5** (11), 2763-2776.
- 143.Grundmann. H, Schneider. C., Hartung. D, Daschner F.D., Pitt. T. L (1995) "Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Clinical Microbiology*. 528-534
- 144.Guinée, P.A.M. y Jansen, W.H. (1987): "Serotyping of *Aeromonas* species using passive haemagglutination". *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene A*, **265**, 305-313.

## H

- 145.Hacket, J. L., Lynch, W. H., Paterson, W. D. y Coombs, D. H. (1984): "Extracelular protease, extracellular hemolysin, and virulence in *Aeromonas salmonicida*". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **41**, 1354-1360.
- 146.Hall. Lucinda M.C. (1994). "Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment lenght polymorphisms that are used to type bacteria?" *Microbiology*. **140**, 197-204.

147. Hammer, B.W (1917)”: Fishiness in evaporated milk”. *Research Bulletin of Iowa Agriculture Experimental Station*, **38**. 233-246.
148. Hänninen, M. L. (1994). “Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources”. *J. Appl. Bacteriol.* **76**. 455-462.
149. Hänninen, M. L., Salmi, S., Mattila, L., Taipalinen, R. y Siitonen, A. (1995). Association of *Aeromonas spp.* with travellers’ diarrhoea in Finland. “*Journal of Medical Microbiology*”. **42**. 26-31.
150. Hänninen, M. L. y Hirvela-Koski, V. (1997). “Pulsed-field gel electrophoresis in the study of mesophilic and psychophilic *Aeromonas spp.*”. *Journal of Applied Microbiology*. **83**. p.493-498.
151. Hänninen, M. L. y Hirvela-Koski, V. (1999). “Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis”. *Epidemiology Infection*. **123**, 299-307.
152. Hansen, J. C. y Bonde, G. J. (1973): “*Aeromonas hydrophila* (s. *liquefaciens*) som mulig arsag til furunkulose hos al”. *Nord, Vet Med.*, **25**, 121-130.
153. Hantke, K. y Braun, V. (1975): “Membrane receptor dependent iron transport in *Escherichia coli*”. *FEBS-letters*, **49**, 301-305.
154. Harf-Monteil, C; Le Fléche, A; Riegel, P; Prévost, G; Bermond, D; Grimont, P.A.D y Monteil, H. (2004): “*Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 481-485.
155. Hasan, J.A.K., Macaluso, P., Carnahan, A.M. y Joseph, S.W, (1992): “Elastolytic activity among *Aeromonas spp.* using a modified bilayer plate assay”. *Diagnostical Microbiology of Infectious Diseases*, **15**, 201-206.
156. Herwig, N. (1979): En “Handbook of Drugs and Chemicals Used in the Treatment of Fish Diseases. A Manual of Fish Pharmacology and Materia Medica”. C. C. Thomas (Ed.). Springfield, Illinois.

157. Hickman-Brenner, F. W., MacDonald, K. L., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Brenner, D. J. y Farmer III, J. J. (1987): “*Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea”. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**, 900-906.
158. Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Arduino, M.J., Brenner, D. J. y Farmer III, J. J. (1988): “*Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens”. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**, 1561-1564.
159. Higuchi, D., Takiuchi, J. y Negi, M. (1981): “The effect of keratinase on human epidermis, especially on stratum corneum”. *Japanese Journal of Dermatology*. **91**, 119-125.
160. Hirst, I.D., Hastings, T. S. y Ellis, A.E. (1991): “Siderophore production by *Aeromonas salmonicida*”. **137**, 1185-1192.
161. Hjetnes, B., Andersen, K., Ellingsen, H.-M. y Egidius, E. (1987): “Experimental studies on the pathogenicity of a *Vibrio* sp. isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., suffering from Hitra disease”. *Journal of Fish Diseases*. **10**, 21-27.
162. Holmes, P., Niccolls, L.M y Sartory, D.P. (1996).”The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment”, p. 127-150. In *The genus Aeromonas*. Edited by B. Austin, M, Altwegg, P.J. Gosling, & S. Joseph. New York: Wiley.
163. Honda, T., Sato, M., Nishimura, T., Higashitsutsumi, M., Fukai, K. y Minwatani, T. (1985): “Demonstration of cholera toxin related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme linked immunosorbent assay”. *Infection and Immunity*, **50**, 322-323.
164. Horsley, R. W. (1973): “The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment”. *Journal of Applied Bacteriology*. **36**, 377-386.
165. Hsu, T. C., Waltman, W. D. y Shotts, E. B. (1981): “Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*”. *Development of Biological Standard*. **49**, 101-111.

- 166.Huss, V.A.R., H. Festl, y K.H. Schleifer. (1983) "Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturalization rates". *System. Appl. Microbiol.* **4**, 184-192.
- 167.Huys, G., Coopman, R., Janssen y P., Kersters, K. (1996). "High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting". *Int.J.Syst Bacteriol* **46**, 572-580.
- 168.Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Lüthy-Hottenstein, J., Vancanneyt, M., Jansen, P y Kersters, K.(1997a). "*Aeromonas popoffi* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs". *Int.J.Syst Bacteriol* **47**, 1165-117.
- 169.Huys, G., Kämpfer.P; Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P.y Kersters, K. (1997b): "Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*". *Int.J.Syst Bacteriol* **47**, 1157-1164.
- 170.Huys, G. y Swings, S. (1999). "Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa". *FEMS Microbiology Letters.* **177**, 83-92.
- 171.Huys, G., Kämpfer.P. y Swings, S. (2001). "New DNA-DNA hybridization and phenotypic data on the species *Aeromonas ichtiosmia* and *Aeromonas allosaccharophila*: *A. ichtiosmia*. Schubert et al. 1990 is a later synonym of *A. veronii* Hickman-Brenner et al. 1987". *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 177-182.
- 172.Huys, G., Kämpfer.P. y Swings, S. (2002a). "*Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stainer 1943. (Approved Lists 1980). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 705-712.
- 173.Huys, G., Rik Denys y Swings, J. (2002b). "DNA-DNA reassociation and phenotypic data indicate synonymy between *Aeromonas enteropelógenes* Schubert et al, 1990 and *Aeromonas trota*, Carnahan et

al 1991". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**, 1969-1972.

174. Huys, G., Marianne Pearson, Kämpfer P., Rik Denys., Margo, C., Inglis., V y Swings, J. (2003). *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**, 885-891.

175. Huys, G., Cnockaert M y Swings, J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brener et al. 1987. *Systematic and Applied Microbiology*. **28**, 604-609.

## I

176. Inamura, H., Muroga, K. y Nakai, T. (1984): "Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*". *Fish Pathology*. **19**, 89-96.

177. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae* (1992). Minutes of the meetings, Osaka, Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **42**, 199-201.

## J

178. Jaccard, P. (1908): "Nouvelles recherches sur la distribution florale". *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, **44**, 223-270.

179. Janda, J. M y Bottone, E. J. (1981): "*Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool". *Journal of Clinical Microbiology*, **14**, 55-60.

180. Janda, J.M., Reitano, M. y Bottone, E.J. (1984): "Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum". *Journal of Clinical Microbiology*. **19**, 44-47.



181. Janda, J.M., Oshiro, L.S., Abbott, S.L. y Duffey, P.S. (1987): "Virulence markers of mesophilic aeromonads: association of the autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a peripheral cell-associated layer". *Infection and Immunity*. **55**, 3070-3077.
182. Janda, J.M. y Duffey, P.S. (1988): "Mesophilic Aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum". *Reviews of Infectious Disease*. **10**, 980-997.
183. Janda, J.M. y Kokka, R.P. (1991). "The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification". *FEMS Microbiology Letters*. **90**, 29-34.
184. Janda, J.M., Guthertz, L.S., Kokka, R.P. y Shimada, T. (1994): "*Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations". *Clin. Infect. Diseases* **19**, 77-83.
185. Janda, J.M., Abbott, S.L., Khasheh S., Kellogg, G.H. y Shimada, T. (1996). "Further studies on Biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*". *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 34, **8**, 1930-1933.
186. Janda, J.M. y Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Diseases* **27**, 332-344.
187. Johnson J.L (1994): "Similarity analysis of DNAs". 655-682. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
188. Joseph, S. W., Carnahan, A. M., Brayton, P. R., Fanning, G. R., Almazan, R., Drabick, C., Trudo, E. W. y Colwell, R. R. (1991): "*Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure". *Journal of Clinical Microbiology*. **29**, 565-569.

189. Joseph, S. W. y Carnahan, A. M. (2000). "Update of the genus *Aeromonas*". *ASM News* **66**, 218-223.

**K**

190. Kampfer, P. y Altwegg, M. (1992): "Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies". *Journal of Applied Bacteriolog.* **72**, 341-351.
191. Kaper, J. B., Lockman, H., Remmers, E. F., Kristensen, K y Colwell, R. R. (1983): "Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from estuarine environments". *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**, 229-255.
192. Kauffmann M.E y Pitt T.L. (1998) "Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Bacterial DNA". In *Methods in Practical Laboratory Bacteriology*. Edited by: N.Woodford and A.P. Johnson. © *Humana Press Inc. Totowa, NJ*. p 83-92.
193. Kauffmann M.E. (1998) "Pulsed-Field Gel Electrophoresis". In *Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular Bacteriology: protocols and Clinical Applications*. Edited by: N.Woodford and A.P. Johnson. © *Humana Press Inc. Totowa, NJ*. p 34-51.
194. Kaznowski, A., Wlodarczak, K. y Paezt, H. (1989): "A numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from water, sewage, water-oil emulsion and fishes". *Systematic and Applied Microbiology*. **12**, 172-178.
195. Kaznowski, A. (1995). "A method of colorimetric DNA-DNA hybridization in microplates with covalently immobilized DNA for identification of *Aeromonas* spp." *Med. Microbiol. Letters*. **4**. p 362-369.
196. Khan A.A. y Cerniglia. C.E.(1997) " Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction". *Letters in Applied Microbiology*. **24**, 233-239.

197. Keusch, G.T. y Donta, J.S. (1975): "Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell culture". *Journal of Infectious Diseases*. **131**, 58-63.
198. King, E. O., Ward, W. K. y Raney, D. E. (1954): "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **44**, 301-307.
199. Kitamikado, M. y Lee Y.-Z. (1975): "Chondroitinase-producing bacteria in natural habitats". *Applied Microbiolog.* **29**, 414-421.
200. Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K y Simidu U. (1993): "Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the bases of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol*; **43**:8-19.
201. Kitao, T., Yoshida, T., Aoki, T., y Fukudome, M, (1984): "Atypical *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of an ulcer disease of eel occurred in Kagoshima prefecture". *Fish Pathology*. **19**, 113-117.
202. Kitaura, T., Doke, S., Azuma, I., Imaida, M., Miyano, K., Harada, K. y Yabuuchi, E. (1983): "Halo production by sulfatase activity of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* O1 on a new selective sodium dodecyl sulfate-containing agar medium: a screening marker in environmental surveillance". *FEMS Microbiological Letter*. **17**, 205-209.
203. Kluyver, A.J, y van Niel, C.B. (1936): "Prospects for a natural system of classification of bacteria". *Zentralblatt für Bakteriologie Orig.* **94**, 369.
204. Kodjo A, Haond F, y Richard Y (1997). "Molecular and phenotypic features of aeromonads isolated from snails (*Helix aspera*) affected with a new summer disease. *J V. Med. B.* **44**: 245-252.
205. Kokka, R.P., Vedros, N. A. y Janda, M. J. (1990): "Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutinating surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*". *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 2240-2247.

206. Kokka, R.T., Lindquist, D., Abbot, S.L. y Janda, J.M. (1992): "Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii*". *Infection and Immunity*, **60**, 2075-2082.
207. Kostrzynska, M., Dooley, J.G., Shimojo, T., Sakata, T. y Trust, T.J. (1992): "Antigenic diversity of S-layer proteins from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*". *Journal of Bacteriology*, **174**, 40-47.
208. Kothary, M.H. y Kreger, A.S. (1985): "Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*". *Infection and Immunity*, **50**, 534-540.
209. Kou, G.-H. (1981): "Some bacterial diseases of eel in Taiwan". En Proceedings of Republic of China- United States Cooperative Science Seminar on Fish Diseases. (NSC Symposium Series No. 3). pág. 11-20. República de China.
210. Kreutzmann, H.-L. (1977): "The effects of chloramphenicol and oxytetracycline on haematopoiesis in European eel (*Anguilla anguilla*)". *Aquaculture*. **10**, 323-334.
211. Krovacek, K., Faris, A. y Mansson, I. (1991): "Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures". *International Journal of Food Microbiology*. **13**, 165-176.
212. Kuchler, R.J. (1977): "Biochemical methods in cell culture and virology". Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. (eds.), Penn, USA.
213. Kuijper, E. J., Steigerwalt, A. G., Schoenmakers, B. S. C. I. M., Peeters, M. F., Zanen, H. C. y Brenner, D. J. (1989): "Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp". *Journal of Clinical Microbiology*. **27**, 132-138.
214. Kusecek, B., Wloch, H., Mercer, A., Vaisanen, V., Piuschke, G., Korhonen, T. y Achtman, M. (1984): "Lipopolysaccharide, capsule, and fimbriae as virulence factors among 01, 07, 016, 018, or 075 and K1, K5, or K100 *Escherichia coli*". *Infection and Immunity*. **43**, 368-379.

215.Kusuda, R. y Takemaru, I. (1978): “*Streptococcus* sp. isolated from an epizootic of cultured eels”. *Bulletin\_of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **53**, 1519-1523.

216.Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. y Fryer, J. L. (1991): “*Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen”. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **41**, 406-409.

## L

217.Laemmli, U.K. (1970): “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*. **227**, 680-685.

218.Lallier, R., Mittal, K.R., Lalonde, G. y Olivier, G. (1981): “Rapid methods for the differentiation of virulent and non-virulent *Aeromonas hydrophila* strains”. *Development Biological Estándar*. **49**, 119-123.

219.Lallier, R., Bernard, F. y Lalonde, G. (1984). “Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish”. *Canadian Journal of Microbiology*. 900-904.

220.Lallier, R. y Higgins, R. (1988): “Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish”. *Veterinary Microbiology*. **18**, 63-71.

221.Larsen, J.L. y Møllergaard, S. (1984): “Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment”. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**, 1261-1264.

222.Lasserre, J. (1972): “Recherche du chloramphenicol utilise en pisciculture dans different tissus de la truite arc-en ciel *Salmo gairdneri* Richardson- consequences therapeutiques et sanitaires”. *Ph. D. Thesis, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort*, Francia.

223.Léblanc, D., Mittal, K.R. y Lallier, R. (1981): “Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish”. *Applied and Environmental Microbiology*. **42**, 56-60.

- 224.Lecomte-Finiger (1983): “Contribution à la connaissance de l’écobiologie de l’anguille *Anguilla anguilla* L”. 1758 des milieuv lagunaires méditerranées du Golfe du Lion: Narbonnais et Roussillon. *Tesis Doctoral. Université du Perpignan, Perpignan.*
- 225.Lee, J. V. (1979): *Alteromonas (Pseudomonas) putrefaciens*. En “Cold Tolerant Microbes in Spoilage and Environment”. Rusell, A. D. y Fuller, R. (Eds.). Pág. 59. *Academic Press. New York.*
- 226.Lee, J. V., Sheread, P., Furniss, A. L., y Bryant, T. N. (1981): “Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (Synonym group F vibrios, group EF6)”; *Journal of Applied Bacteriology*, **50**, 73-94.
- 227.Lee, J. V. y Donovan, T. J. (1985): *Vibrio, Aeromonas y Plesiomonas*. En “Isolation and Identification of Micro-organisms of Medical and Veterinary Importance”. Pág. 13-33. *Society for Applied Bacteriology.*
- 228.Lee, K. K. y Ellis; A.E. (1990): “Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with LPS is a major lethal exotoxin ans cytolsyn of *Aeromonas salmonicida*. The LPS stabilises and enhances the enzyme’s toxicity”. *Journal of Bacteriology*. **172**, 5382-5393.
- 229.Lehmann K.B. Newmann R. (1896). “Atlas un Grundriss der Bakteriologie”. *Munich: JF Lehmann.*
- 230.Lehmann, J., Mock, D., Stürenberg, F.-J. y Bernardet, J.-F. (1991): “First isolation of *Cytophaga psycrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids”. *Diseases of Aquatic Oreanisms*. **10**, 217-220.
- 231.Lemos, M.L., Mazoy, R., Conchas, R.F. y Toranzo, A.E. (1991): “Presence of iron uptake mechanisms in environmental non-pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*”. *Bulletin of the European Association of Fish\_Pathologists*. **11**, 150-152.
- 232.Leung, K.Y. (1987): “The role of proteases of *Aeromonas hydrophila* in infections of rainbow trout”. *Ph Thesis. University of Gueelph, Ontario. Canadá.*
- 233.Levanon, N., Motro, B., Levanon, D., y Degani, G (1986): “The dynamics of *Aeromonas hydrophila* in the water of tanks used to nurse elvers of the European eel *Anguilla anguilla*”. *Bamideb*. **38**, 55-63.

- 234.Lindahl, M., Faris, A., Wadström, T. y Hjertén, S. (1981): "A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells". *Biochimica et Biophysica Acta*. **677**, 471-476.
- 235.Livesley, M. A., Smith. S. N, Armstrong R.A y Barker G. A (1997). "Analysis of plasmid profiles of *Aeromonas salmonicida* isolates by pulsed field gel electrophoresis". *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 297-301.
- 236.Livesley M.A, Smith. S.N, Armstrong. R. A y Barker. G. A. (1999): "Characterization of *Aeromonas* strains and species by pulsed field gel electrophoresis and principal components analysis". *Journal of Fish Diseases*, **22**, 369-375.
- 237.Ljungh, A., Wretlind, B. y Wadstrom, T. (1978): "Evidence for enterotoxin and two cytotoxic toxins in human isolates of *Aeromonas hydrophila*". En *Toxins: animal, plant and microbial*. Rosemberg (Ed.). pag 947. Pergamond Press. Oxford.
- 238.Ljungh, A., Wretlind, B. y Molley, B. (1981): "Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*". *Acta of Pathology and Microbiology of Scandinavia*, B 89, 387-397.
- 239.Ljungh, A. y Kronevi, T. (1982): "*Aeromonas hydrophila* toxins intestinal fluid accumulation and mucosal injury in animal models". *Toxicon*. **2**, 397-407.
- 240.Ljungh, A. y Wadstrom, T. (1982): "*Aeromonas* toxin". *Pharmac. Ther.* **15**, 339-354.
- 241.Logan, S.M. y Trust, T.J. (1984): "Structural and antigenic heterogeneity of the lipopolysaccharides of *Campylobacter coli*". *Infection and Immunity*. **45**, 210-216.
- 242.Lowry, O.H., Rosenbrough, N., Farr, L. y Randall, R.J. (1951): "Protein measurement with the folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*. **193**, 265-275.

**M**

243. MacInnes, J.I., Trust, T.J., y Crosa, J.H. (1979): "Deoxyribonucleic acid relationship among members of the genus *Aeromonas*". *Canadian Journal of Microbiology*. **25**, 579-586.
244. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning: A laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
245. Markwardt, N. M. y Klontz, G. W. (1989). "Evaluation of four methods to establish asymptomatic carriers of *Aeromonas salmonicida* in juvenile spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum)". *Journal of Fish Diseases*. **12**, 311-315.
246. Marmur, J (1961). "A procedure for the isolation of Deoxyribonucleic acid from microorganisms". *J.Mol.Biol.***3**, 208-218.
247. Marmur, J y Dothy, P. (1962). "Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature". *J.Mol.Biol.***3**, 208-218.
248. Martinelli Luchini, G. y Altwegg, M. (1992): "rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **42**, 384-389.
249. Martínez-Murcia, A. J., Esteve, C., Garay, E. y Collins, M. D. (1992a). "*Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*". *FEMS Microbiological Letters*. **91**, 199-206.
250. Martínez-Murcia, A J., Benlloch, S. y Collins, M.D. (1992b): "Phylogenetic interrelationship of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **42**, 412-421.
251. Martínez-Murcia, A.J. (1999): "Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffi*, *Aeromonas* DNA hybridization Group 11 and *Aeromonas* Group 501". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**, 1403-1408.



252. Massad, G., Arceneaux, J. E. L. y Byers, B. R. (1991): "Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species". *Journal of General Microbiology*. **137**, 237-241.
253. McCoy, R. H. y Pilcher, K. S. (1974): "Peptone beef extract glycogen agar, a selective and differential *Aeromonas* medium". *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31, 1553- 1555.
254. Merino, S. y Tomás, J. M. (1988): "Characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated on a septicemic out-break in a fish-farm of Spain". *Microbiología SEM*. **4**, 181-184.
255. Meske, C. (1985): "Fresh and brackish warm water fish: Eels (*Anguilla* spp.)". En *Fish Aquaculture, Technology and Experiments*. Cap. III. Aquaculture-In Practice. F. Vogt (ed.), pág. 21-22. Pergamon Press. Oxford.
256. Michel, C. y Bernardet, J.-F. (1991): "Identification and phenotypic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from farmed European eel *Anguilla anguilla* in France". En *Diseases of Fish and Shellfish*. pág. 185. EAFP meeting. Budapest.
257. Mikx, F.H.M. y DeJong, M.H. (1987): "Keratinolytic activity of cutaneous and oral bacteria". *Infection and Immunity*. **55**, 621-625.
258. Miles, A.A y Halnan, E.T. (1937): "A new species of microorganisms (*Proteus melanovogenes*) causing black rot in eggs". *Journal of Higiene*. **37**. 79
259. Mittal, K.R., Lalonde, G., Leblanc, D., Olivier, G. y Lallier, R. (1980): "Aeromonas hydrophila in rainbow trout: relationship between virulence and surface characteristics". *Canadian Journal of Microbiology*. **26**, 1501-1503.
260. Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M.C y Lorén J.G. (2004): "Aeromonas molluscorum sp. nov., isolated from bivalve molluscs". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 2073-2078.

261. Munn, C.B., Ishiguro, E.E., Kay, W.W. y Trust, T.J. (1982): "Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*". *Infection and Immunity*. **36**, 1069-1075.
262. Munro, A. L. S y Hastings, T. S. (1993). "Furunculosis". Capítulo 7. *Bacterial Fish Diseases*. p 122-142. Blackwell scientific Publications.
263. Murray, B.E. Heath, J.D., Sharma, B. R y Weingstock, A.M., "Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites". *J. Clin. Microbiol.* **28**. 2059

## N

264. Neilands, J.B. (1974): "Iron and its role in microbial physiology", En *Microbial iron metabolism* J.B. Neilands (ed.). pág. 4-31. Academic Press, New York.
265. Neilands, J.B. (1981): "Microbial iron compounds". *Annual Review of Biochemistr.* **50**, 715-731.
266. Neilands, J.B. (1982): "Microbial envelope proteins related to iron". *Annual Review of Microbiology.* **36**, 285-309.
267. Nielsen B., Olsen J.E. y Larsen J. L" Plasmid profiling as an epidemiological marker within *Aeromonas salmonicida*". *Dis. Aquat Org.* **15**. 129-135.
268. Nieto, T. P., Corcobado, M. J. R., Toranzo, A. E. y Barja, J. L. (1985): "Relation of water temperature to infection of *Salmo gairdneri* with motile *Aeromonas*". *Fish Pathology.* **20**, 99-105.
269. Nomura, J. y Aoki, T. (1985): "Morphological analysis of lipopolysaccharide from gram-negative fish pathogenic bacteria". *Fish Pathology.* **20**(2/3), 193-197.
270. Nord, C.E., Sjoberg, L., Wadstrom, T. y Wretlind, B. (1975): "Characterization of three *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species by

extracellular enzymes and hemolysins". *Medical Microbiology and Immunology*. **161**, 79-87.

## O

271. O'Brien, D., Mooney, J., Ryan, D., Powell, E., Hiney, M y Powell, T. (1994). "Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from a tank effluent of hatch reared atlantic salmon smolts". *Appl Environ Microbiol* **60**, 3874-3877
272. Olivier, G. (1990): "Virulence of *Aeromonas salmonicida*: Lack of relationship with phenotypic characteristics". *Journal of Aquatic Animal Health*. **2**, 119-127.
273. Ortigosa, M., Esteve, C. y Pujalte, M. J. (1989): "Vibrio species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy". *Systematic and Applied Microbiology*. **12**, 316-325.
274. Owen, R.J. y Hill, L.R. (1979). "The estimation of base composition, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids". In *Identification Methods for Microbiologists*, 2<sup>nd</sup> edn. Pp. 217-298. Edited by F.A. Skinner & D.W. Lovelock. London: Academic Press.

## P

275. Paik, G. (1980): "Reagents, stains, and miscellaneous test procedures". En *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. E, H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., y J. P. Truant (eds.). pág. 1000-1024. ASM. Washington.
276. Pal, A., Ramamurthy, T., Ghosh, A.R., Pal, S.C., Takeda, Y. y Balakrish Nair, G. (1992): "Virulence traits of *Aeromonas* strains in relation to species and source of isolation". *Zentralblatt für Bakteriologie*. **276**, 418-428.
277. Palleroni, N. J. (1984): "Genus *I. Pseudomonas migula* 1894, 237<sup>AL</sup> (Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 237)". En *Bergey's Manual of*

- Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Section 4. N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.). IX edition. pág. 141-198. Williams & Wilkins. Baltimore/London.
278. Pathak, S. P., Bhattacharjee, J. W., Kalra, N. y Chandra, S. (1988): "Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish". *Journal of Applied Bacteriology*. **65**, 347-352.
279. Paula, S.J., Duffey, P.S., Abbot, S.L., Kokka, R.P., Oshiro, L.S., Janda, J.M., Shimada, T. y Sakazaki, R. (1988): "Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads". *Infection and Immunity*. **56**, 2658-2665.
280. Pavan, M.E, Sharon, L. Abbott, Zorzopulos, J. y Janda, J.M. (2000): "*Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolitica* subsp. nov., a new pectinase positive subspecies isolated from heavily polluted river". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 1119-1124.
281. Payne, S.M. y Finkelstein, R.A. (1975): "Pathogenesis and immunology of experimental gonococcal infection: role of iron in virulence". *Infection and Immunity*. **12**, 1313-1318.
282. Pivnick, H. y Sabina, L.R. (1957): "Studies of *Aeromonas formicans*". *Journal of Bacteriology*. **73**, 247- 252.
283. Plikaytis, B.D., Carlone, G.M., Edmonds, P. y Mayer, L.W. (1986): "Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis". *Analytical Biochemistry*. **152**, 346-364.
284. Popoff, M. y Véron, M. (1976): "A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group". *Journal of General Microbiology*. **94**, 11-22.
285. Popoff, M. Y., Coynault, C., Kiredjian, M. y Lemelin, M. (1981): "Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species". *Current Microbiology*. **5**, 109-114.
286. Popoff, M. (1984): "*Genus III. Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936, 398<sup>AL</sup>". En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Section 5. N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.) IX edition. pág. 545-547. Williams & Wilkins. Baltimore/London.

287. Pribham, E. (1933b). "*Proteus salmonicida*. (Emmerich and Weibel)". Pribham, p 73. In *Klassifikation der Schizomyceten* Franz Deuticke. Leipzig.
288. Pujalte, M. J., Ortiz-Conde, B., Steven, S. E., Esteve, C., Garay, E. y Colwell, R. R. (1992): "Numerical taxonomy and nucleic acid studies of *Vibrio mediterranei*". *Systematic and Applied Microbiology*. **15**, 82-91.
289. Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J.A. y Pédrola-Angulo, G. (1988): "Microbiología y Parasitología Médica". *Salvat Editores*, S.A. pág. 133-188, Barcelona.

## R

290. Rabsch, W.P.P. y Reissbrodt, R. (1986): "DHBA (2,3-dihydroxyhenzoessäure)-ausscheidung durch einen enterobactinnegativen multiresistenten *Salmonella typhimurium*-Wildstamm". *Journal of Basic Microbiology*. **2**, 113-116.
291. Rabsch, W.P.P. y Reissbrodt, R. (1992): "Iron supply of bacteria and its relevance for infectious processes". *BIOfourm Mikrobiologie*. **15**, 10-15.
292. Rahim, Z. Sanyal, S.C., Aziz, K.M.S., Huq, M.I. y Chowdhury, A.A. (1984): "Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh". *Applied and Environmental Microbiology*. **48**, 865-867.
293. Rasmussen, H.B. (1987): "Subgrouping of lipopolysaccharide O antigens from *Vibrio anguillarum* serogroup 02 by immunoelectrophoretical analyses". *Current Microbiology* **16**, 39-42.
294. Ravagnan, G. (1978): "Metodi di allevamento intensivo dell'anguilla". En *Elementi di Vallicoltura Moderna*. Cap. 2. pág. 101-127. Edagricole Bologna.
295. Reed, M. J. y Muench, M. (1938): "A simple method for estimating fifty percent endpoints". *American Journal of Hygiene*. **27**, 493-497.

296. Reichenbach, H. y Dworkin, M. (1981): "The order Cytophagales (with addenda on the genera *Herpetosiphon*, *Saprospira*, and *Flexithrix*)". En *The Prokaryotes*. Vol. 2. Section C. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows y H. G. Schlegel (eds.). pág. 356-379. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
297. Rickards, W. L. (ed.) (1978): En "A Diagnostic Manual of Eel Diseases Occurring Under Culture Conditions in Japan". *Sea Grant Publication UNC- SG-78-06*. Carolina del Norte.
298. Riddle, L.M., Graham, T.E., Amborski, R.L. y Hugh-Jones, M. (1981): "Production of hemolysin and protease by *Aeromonas hydrophila* in a chemical defined medium". En *Fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Development in Biological Standard* **49**, 125-133.
299. Rigney, M.M., Zelinsky, J.W. y Rouf, M.A. (1978): "Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red-leg disease of frogs". *Current Microbiology*. **1**, 175-179.
300. Roberts, R. J. y Horne, M. T. (1978): "Bacterial meningitis in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, affected with chronic pancreatic necrosis". *Journal of Fish Diseases*. **1**, 157-164.
301. Roberts, R. J. (1993). "Motile *Aeromonad* septicaemia". Capítulo 8. *Bacterial Fish Diseases*. p 143-156). Blackwell scientific Publications.
302. Rodríguez, L.A. (1991): "Caracterización de toxinas extracelulares en *Aeromonas hydrophila* (cepa B<sub>32</sub>)". Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, Orense. España.
303. Rohlf, F. J. (1998): "*NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*". Versión 2.0. Exeter Publishing, Ltd. Nueva York.
304. Ruimy, R.B; Elbaze. P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M y Christein, R. (1994). "Phylogenetic Analysis and Assesment of the Genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* Deduced from Small- Subunit rRNA sequences". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**. p 416-426.

## S

305. Sakata, T. y Koreeda, Y. (1986): "A numerical taxonomic study of the dominant bacteria isolated from *Tilapia* intestines". *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **52**, 1625-1634.
306. Sakata, T. (1988): "Serum sensitivity of a fish pathogenic strain and its LPS mutants of *Aeromonas hydrophila*". *Memorandum of the Faculty of Fisheries of Kagoshima University*. **37**, 147-159.
307. Sakazaki, R. y Shimada, T. (1984): "O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains". *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. **37**, 247-255.
308. Sanarelli, G. (1891): "Über einen neuen mikroorganismus des wassers, welcher für thiere mit veränderlicher und konstanter temperatur pathogen ist". *Zentralblatt fuer Bakteriologie Origin*, 189-192.
309. Santos, Y., Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Nieto, T.P. y Barja, J.L. (1987): "Relationship among virulence for fish, enterotoxigenicity and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*". *Aquaculture*. **67**, 29-39.
310. Santos, Y., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Nieto, T. P. y Vila, T. G. (1988): "Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains from fish culture systems". *Infection and Immunity*. **56**, 3285-3293.
311. Santos, Y., Bandín, I., Nieto, T.P., Nuñez, S. y Toranzo, A.E. (1989): "Haemolytic and agglutinating activities of motile *Aeromonas* from fish culture systems". *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. **9**, 31-34.
312. Santos, Y. (1991): "Factores de virulencia y características antigénicas de *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas* móviles". Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. España.
313. Santos, Y., Bandín, I., Nuñez, S., Nieto, T.P. y Toranzo, A.E. (1991): "Serotyping of motile *Aeromonas* species in relation to virulence

- phenotype". *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. **11**, 153-155.
- 314.Seward. R.J., Ehrenstein. B. Grundmann .H.J. y Towner. K.J. (1997). "Direct comparison of two commercially available computer programs for analysing DNA fingerprinting gels". *J. Med. Microbiol.* **46**. p 314-320.
315. Scherago, M. (1936): "An epizootic septicemia of young guinea pigs caused by *Pseudomonas caviae* nov. sp". *Journal of Bacteriology*. **31**, 83.
- 316.Schubert, R. H. (1963): "Über die biochemischen Eigenschaften von *Aeromonas hydrophila*". *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene*.**188**: 62-69.
- 317.Schubert, R.H.W (1967a): "The Taxonomy and Nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936. I. Suggestions on the taxonomy and Nomenclature of the Aerogenic *Aeromonas* species". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **17**: 23-37.
- 318.Schubert, R.H.W (1967 b): "The Taxonomy and Nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936. II. Suggestions on the taxonomy and Nomenclature of the Aerogenic *Aeromonas* species". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **17**: 273-279.
- 319.Schubert, R. H. (1969): "Über den Aminosäureverwendungsstoff wechsel bei Angehörigen des genus *Aeromonas*". *Zentralblatt für Bakteriologie I*.**211**: 402-405.
- 320.Schubert, R. H. (1969): "Infraspezifische Taxonomie von *Aeromonas hydrophila*". *Zentralblatt für Bakteriologie I*. **211**: 407-409.
- 321.Schubert, R. H. W. (1974): "Genus II. *Aeromonas Kluver and van Niel 1936, 398*". En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Part 8. Buchanan, R.E. y Gibbons, N, E. (eds.) VIII edition. pág. 345-358. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- 322.Schubert, R. H. W. (1984): "Genus IV. *Plesiomonas Habs and Schubert 1962, 324<sup>AL</sup>*". En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Section 5.



- Vol. I. Krieg, N. R. y Holt, J. G. (eds.). IX edition. pág. 548-550. Williams & Wilkins. Baltimore.
323. Schubert, R. H. W. y Hegazi, M. (1988): “*Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a latter and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*”. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene* . **268**, 34-39.
324. Schubert, R. H. W. y Matzinou, D. (1990): “Temperature as an environmental factor influencing the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*”. *Zentralblatt für Bakteriologie*. **273**, 327-331.
325. Schubert, R. H. W., Hegazi, M. y Wahlig, W. (1990a): “*Aeromonas enteropelogenes* species nova”. *Hygiene+ Medizin*. **15**, 471-472.
326. Schubert, R. H. W., Hegazi, M. y Wahlig, W. (1990b): “*Aeromonas ichthiosmia* species nova”. *Hygiene+ Medizin*. **15**, 477-479.
327. Sharon, N. y Ofek, I. (1983): “Cómo se adhieren las bacterias a las células”. *Mundo Científico*. **25**, 564-566.
328. Shaw, D.H. y Hodder, H. J. (1978): “Lipopolysaccharides of the motile aeromonads; core oligosaccharide analysis as an aid to taxonomic classification”. *Canadian Journal of Microbiology*. **24**, 864-868.
329. Shimada, T. y Kosako, Y. (1992): “Comparison of two O-serogrouping systems for mesophilic *Aeromonas* spp”. *Journal of Clinical Microbiology*. **29**, 197-199.
330. Shotts, E.B., Hsu, T.C. y Waltman, W.D. (1985): “Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex”. *Fish Pathology*. **20**, 37-44.
331. Sleytr, U.B. y Messner, P. (1983): “Crystalline surface layers on bacteria”. *Annual Reviews of Microbiology*. **37**, 311-339.
332. Smibert, R. M. y Krieg, N. R. (1981): “General characterization”. En *Manual of Methods for General Bacteriology*. Cap. V, Systematics. N. R. Krieg (ed.). pág. 409-443. ASM. Washington.

333. Smith, I.W (1963). "The Classification of *Bacterium salmonicida*". *Journal of General Microbiology*. **33**. 263-274.
334. Smith, H. (1977): "Microbial surfaces in relation to pathogenicity". *Bacteriological Reviews*. **41**, 475.
335. Sneath, P. H. A. (1972): "Computer taxonomy". En *Methods in Microbiology*. Vol. 7A, Cap. II. pág. 29-98. Academic Press. Londres.
336. Sneath, P. H. A. y Johnson, R. (1972): "The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests". *Journal of General Microbiology*. **72**, 377-392.
337. Sneath, P. H. A, y Sokal, R. R. (1973): In *Numerical taxonomy*. "The Principles and Practice of Numerical Classification". D. Kennedy & R. B. Park (eds.). Freeman and Co. San Francisco.
338. Snieszko, S.F. (1957): Genus IV. "*Aeromonas Kluyver and van Niel 1936, 398*". En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Breed, R.S., Murray, E.G.D. y Smith, N.R. (eds.). VII edition, pág.189-192. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
339. Soler L., Yañez M. A., Chacón M.R., Aguilera-Arreola M.G., Catalán V., Figueras M.J and Martínez-Murcia A.J (2004). "Phylogenetic análisis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1511-1519.
340. Sorensen, U.B, S y Larsen, J.L. (1986): "Serotyping of *Vibrio anguillarum*". *Applied and Environmental-Microbiology*. **51**, 593-597.
341. Stackebrandt, E. y Goebel, B.M. (1994). "Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology". *Int. J. Syst Bacteriol*. **44**, 846-849.
342. Stainer R.Y. (1934) "A Note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*". *Journal of Bacteriology*. **46**:213.
343. Stainer R.Y, Palleroni. N.J. y Doudoroff, N. (1966) "The aerobic *Pseudomonas* a taxonomic study". *Journal of General Microbiology*. **43**:159-271.

344. Stelma Jr., G.N. (1988): "Virulence factors associated with pathogenicity of *Aeromonas* isolates". *Journal of Food Safety*, 9, 1-9.
345. Stelma Jr., G.N., Johson, C.H. y Spaulding, P.L. (1988): "Experimental evidence for enteropathogenicity in *Aeromonas veronii*". *Canadian Journal of Microbiology*. **34**, 877- 880.
346. Stevenson, R.M.W. y Allan, B.J. (1981): "Extracellular virulence products in *Aeromonas hydrophila* disease processes in salmonids". *Development of Biological Standard*. **49**, 173-180.
347. Sugita, H., Tsunohara, M., Fukumoto, M. y Deguchi, Y. (1987): "Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes". *Nippon Suisan Gakkaishi*. **53**, 287-290.
348. Sundaram, S. y Murthy, K. V. (1983): "Occurrence of 2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl-pteridine (O/129) resistance in human isolates of *Vibrio cholerae*". *FEMS Microbiological Letters*. **19**, 115-117.
349. Switzer, R.C., Merrill, C.R. y Shifrin, S. (1979): "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels". *Analytical Biochemistry*. **98**, 231-237.

## T

350. Talon D., Dupont M.J., Lesne J., Thouverez M. y Michel-Briand Y (1996). "Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*". *Journal of Appl. Bacteriol.*, **80**, 277-282.
351. Tenover, F.C., Arbeit, R. D, Goering, R.V, Mickelsen, P.A; Murray, B.E; Persing, D.H y Swaminathan. B. (1995). **Guest commentary**. "Interpreting Chromosomal DNA restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain Typing". *Journal of Clinical Microbiology*. p.2233-2239.

352. Thornley, M. J. (1960): "The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism". *Journal of Applied Bacteriology*. **23**, 37-52.
353. Thune, R.L., Graham, T.E., Riddle, L.M. y Amborsky, R.L. (1982a): "Extracellular products and endotoxin from *Aeromonas hydrophila*: effects on age-0 channel catfish". *Transactions of the American Fisheries Society*. **111**, 404-408.
354. Thune, R.L., Graham, T.E., Riddle, L.M. y Amborsky, R.L. (1982b): "Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 channel catfish". *Transactions of the American Fisheries Society*. **111**, 749-754.
355. Thune, R.L., Graham, T.E., Riddle, L.M. y Amborsky, R.L. (1986): "*Aeromonas hydrophila*  $\beta$ -hemolysin: purification and examination of its role in virulence in 0-group channel catfish; *Ictalurus punctatus* (Rafinesque)" *Journal of Fish Diseases* **9**: 55-61.
356. Titball, R. W. y Munn, C. B. (1981): "Evidence for two haemolytic activities from *Aeromonas salmonicida*". *FEMS Microbiological Letters*. **12**, 27-30.
357. Threlfall E.J, Ridley A.M. y Hampton, M. (1996). "Technical Advances in the bacteriological laboratory: methods for DNA analysis". *PHLS Microbiology Digest* **13** (3).
358. Threlfall E.J, Ridley A.M. y Hampton, M. (1998). "Application of Molecular Methods to *Salmonella* epidemiology". Aspán A, Mulder Raw (Eds). COST Action 97: 4. *Development of monitoring procedures, rapid detection methods and techniques. Molecular epidemiology of Campylobacter and Salmonella*. European Commission. EUR 18209 EM, 1998. pp 45-51.
359. Trust, T. J. y Sparrow, R. A. H. (1974): "The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes". *Canadian Journal of Microbiology*. **20**, 1219-1228.
360. Trust, T. J. (1975): "Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in freshwater". *Journal of Applied Bacteriology*. **38**, 225-233.

361. Trust, T.J., Courtice, I.D. y Atkinson, H.M. (1980): "Hemagglutination properties of *Aeromonas*". En: *Fish Diseases. Third COPRAQ-Session* Ahne, W. (ed). pág. 218-223. Springer-Verlag, Berlin.
362. Trust, T.J., Kay, W.W. y Ishiguro, E.E. (1983): "Cell surface hydrophobicity and macrophage- association of *Aeromonas salmonicida*". *Current Microbiology*. **9**, 315-318.
363. Tsai, C., y Frasch, C.E. (1982): "A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels". *Analytic Biochemistry*. **119**, 115-119.

## U

364. Umelo, E y Trust, T.J. (1998). "Physical map of the chromosome of *Aeromonas salmonicida* and genomic comparisons between *Aeromonas* strains". *Microbiology*. **144**, 2141-2149.

## V

365. Valera, L y Esteve, MC. (2002) "Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*". *Journal of Applied Microbiology*. **93**, 77-95.
366. Vyankatesh, P., Kaznowski, A., Narayan, N., Patoles, M. y Shouche, Y. (2002). "Isolation and identification of *Aeromonas culicicola* sp. nov. (MTCC3249) from midgut of *Culex quinquefasciatus*". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **52**, 1723-1728.+7

## W

367. Wadstrom, T., Ljungh, A. y Wretlind, B. (1976): "Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections". *Acta of Pathology and Microbiology of Scandinavia*. **B 84**, 112-114.

368. Wretling, B. y Wadstrom, T. (1977). "Purification and properties of a protease with elastase activity from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **103**, 319-327.
369. Wakabayashi, H., Kanai, K., Hsu, T- Ch. y Egusa, S. (1981): "Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1976 to fishes". *Fish Pathology*, 319-325.
370. Wayne, L.G. y Neilands, J.B. (1975): "Evidence for common binding sites for ferrichrome compounds and bacteriophage O80 in the cell envelope of *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology.* **121**, 497-503.
371. Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, W.E., Murray, R.G., Stackebrandt, E., Starr, M.P. y Trüper, H.G. (1987): "Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 463-464.
372. Weinberg, E.D. (1978): "Iron and infection". *Microbiological Reviews.* **42**, 45-66.
373. Welding, J.C y Levine, M (1923). "An artificial key to the species and varieties of the colon-typhoid or intestinal group of bacilli. *Abstract. Bacteriol.* **7**: 13-16.
374. West, PA. y Colwell, R, R. (1984): "Identification and classification of *Vibrionaceae*- an overview". In *Vibrios in the environment*. Colwell, R.R. (ed.), pág. 331. John Willey & Sons, New York.
375. West, P. A., Brayton, P. R. y Colwell, R. R. (1986): "Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments". *International Journal of Systematic Bacteriology.* **36**, 531-543.
376. Woese, C.R y Fox, G. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms". *Proc. Natl Acad. Sc.USA.* **74**, 5088-5090.
377. Woese, C.R. Gutell; R., Gupta. R., y Noller; H.F. (1983): "Detailed analysis of the higher-order structure of the 16-like ribosomal ribonucleic acids". *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.

378. Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke T.J y Fox, G.E (1985). "A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *System Appl. Microb.* **6**: 143-151.
379. Woese, C.R. (1987): "Bacterial Evolution". *Microb Rev.* **51**: 221-271.
380. Wretling, B. y Heden, L. (1973): "Formation of extracellular haemolysin by *Aeromonas hydrophila* in relation to protease and staphylolytic enzyme". *Journal of General Microbiology*, **78**, 57-65.

## Y

381. Yáñez, M.A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M.J. y Martínez-Murcia, A.J. (2003). "Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on GyrB gene sequences". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol.* **53**, 875-883.
382. Yoh, M., Honda, T. y Miwatani, T. (1985): "Production by non-O1 *Vibrio cholerae* of hemolysin related to thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*". *FEMS Microbiological Letters*, **29**, 197-200.

## Z

383. Zimmermann OER. "Die Bakterien unserer trink-und Nutzwasser" (1890). Part 1. *Bert Naturwisch Gas Chemnitz*. 1: 38-39.
384. Zywno, S.R., Arceneaux, J. E. L., Altwegg, M. y Byers, B.R. (1992): "Siderophore production and DNA hybridization groups of *Aeromonas* spp." *Journal of Clinical Microbiology*. **30**, 619-622.