



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME TÉCNICO

DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

NADIA CITLALLY GUTIERREZ AGUILAR

NOMBRE DEL PROYECTO:

**“EFECTO DEL USO COMO SUSTRATO LAS HECES DE GANADO BOVINO SOBRE
LOS INTEGRONES DE LAS HECES DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA
(*Eisenia foetida*)”**

ASESOR: DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA

PERIODO DE REALIZACION:

JULIO-DICIEMBRE DEL 2014

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACION	2
OBJETIVOS	3
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE PARTICIPACIÓN.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
ALCANCES Y LIMITACIONES	6
CAPÍTULO 1.- FUNDAMENTO TEORICO	7
1.1.-GENERALIDADES DE LA LOMBRIZ (<i>Eisenia foetida</i>).....	8
1.2.-SISTEMA DIGESTIVO	8
1.3.-USOS DE LAS LOMBRICES	10
1.4.-ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO (HECES DE GANADO BOVINO)	12
1.5.-FACTORES IMPORTANTES PARA EL MANEJO DEL SUSTRATO	13
1.6.-ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO A NIVEL CELULAR ENTRE LOMBRIZ- BACTERIA	14
1.7.- ¿QUE SON LOS INTEGRONES?.....	16
1.8.-AMPLIFICACION DEL DNA.....	17
CAPÍTULO 2.-METODOLOGIA	19
2.1.- RESULTADOS.....	35
2.1.1.- ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LA VERMICOMPOSTA (CON HECES DE GANADO BOVINO).....	35
2.1.2.- AISLAMIENTOS DE LA BACTERIA DEL TRACTO DIGESTIVO DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA <i>Eisenia foetida</i>	41
2.1.3.-ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE BACTERIAS AISLADAS	42
2.1.4.-RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN Y COMPROBACIÓN DEL DNA.....	43
2.1.5.- RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DE LONGITUD DE LA LOMBRIZ <i>Eisenia foetida</i> SUSTRATO “HECES DE GANADO BOVINO” CON TIPO DE RIEGO DE “AGUA POTABLE Y AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)”	45
2.1.6.- ANALISIS ESTADISTICO DE LAS MEDICIONES DEL DIAMETRO DE LA LOMBRIZ <i>Eisenia foetida</i> SUSTRATO “HECES DE GANADO BOVINO” CON TIPO DE RIEGO DE “AGUA POTABLE Y AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)”	46

2.2.-CONCLUSION.....	48
2.3.-RECOMENDACIONES.....	49
2.4.-REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	50
ANEXO 1.....	53

INDICE DE FIGURAS:

1.-Mapa de localización del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.....	4
2.- Vista dorsal de estructuras internas de la lombriz de tierra (Tomado de Mendoza, 2008).....	9
3.- Amplificación del DNA por PCR (tomado de Rodicio et al, 2004)	17
4.- Muestra el proceso de aislar las bacterias a partir de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i> en medio de cultivo líquido (LB) para después sembrar en placa.....	27
5.- Muestra los pasos llevados a cabo para hacer la estría cruzada en placa.	29
6.- Muestra el extendido que se hizo con el inóculo para formar la estría masiva en la placa.....	29
7.-Morfología que se observaron durante el análisis microscópico de la tinción de Gram	43
8.- Observación de la extracción del DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis (a) tratamiento con agua de pescado (estanque) y (b) tratamiento con agua potable.....	43
9.- Se observa el análisis de ANOVA simple para la variable longitud de lombriz, según prueba de tukey < 0.05, con el programa statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.	45

10.- Se observa el análisis de ANOVA simple para la variable longitud de lombriz, según prueba de tukey < 0.05, con el programa statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.	46
11.-Análisis físico-químicos del suelo (humedad, pH, CRA, textura y conductividad eléctrica).....	61
12.- Obtención de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i>	62
13.- Preparación del medio de cultivo LB con NaCl al 6%	62
14.- Antibióticos (tubo 20 es ciprofloxacino y tubo 24 es trimetoprima) utilizados para lograr la amplificación de células portadoras del integrón.....	63
15.- Crecimiento de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz <i>Eisenia foetida</i> en medio de cultivo LB.	63
16.-Preparación para inocular cajas con agar base rojo fenol.	64
17.- Cajas inoculas con bacterias aisladas de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i> del medio de cultivo.	64
18.- Características macroscópicas en medio solido de las bacterias aisladas.	65
19.- Realización de la tinción de gran para la observación microscópica de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz <i>Eisenia foetida</i>	65
20.- Muestras de las bacteria aisladas de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i> para la extracción y amplificación del DNA.....	66
21.- Extracción del DNA de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i>	66
22.- Observación de la extracción del DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis (a) es tratamiento con agua de pescado (estanque) y (b) tratamiento con agua potable.....	67

INDICE DE CUADROS:

1.- Datos comparativos de pH(Olivares et al., 2012).....	19
2.- Datos comparativos de conductividad eléctrica (Norma Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2008).....	22
3.- Datos de diferenciación de pH en los dos tratamientos del análisis de la vermicomposta.	35
4.- Diferenciación del análisis de conductividad eléctrica en los 2 tratamientos de humectación de la vermicomposta.	37
5.-Datos de corrección por temperatura (Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.Método AS-09).	38
6.- Replica para el aislamiento bacteriano de las heces de la lombriz roja californiana <i>Eisenia foetida</i> en medio de cultivo LB.....	54
7.- Datos de crecimiento bacteriano en medio de cultivo (LB) con NaCl al 6% con dos tipos de tratamientos.	55
9.- Resultados del crecimiento bacteriano suplementado con antibiótico “Ciprofloxacino” en un medio de cultivo LB con un PH de 9 y en cajas Petri a la misma concentración de NaCl.....	57
10.- Resultados del crecimiento bacteriano suplementado con antibiótico “Trimetoprima” en un medio de cultivo LB con un pH de 9 y en cajas Petri a la misma concentración de NaCl y pH.....	58
11.- Datos diferenciales de la visualización de bacterias	59
12.-Sustrato de heces de ganado bovino humectadas agua de peces a los 155 días derivó en un 10% mayor longitud que su similar sin agua de peces (estanque), un 19% mayor longitud para el mismo tratamiento al día 0 y un 24.8% mayor longitud que el tratamiento con agua potable a los 0 día.....	59
13.-Sustrato de heces de ganado bovino y humectas con agua de peces a los 155 días, mostraron un 2.6 a 7.5 % más de diámetro que las lombrices de los otros tratamientos.....	60

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han buscado alternativas para restaurar los suelos contaminados. Con el paso del tiempo, estos contaminantes quedan atrapados en el suelo, lo cual va causando su deterioro y empobrecimiento para las plantas y microorganismos que habitan en él.

Las lombrices de la especie *Eisenia foetida* son organismos modelo apropiados para medir la biodisponibilidad de un compuesto tóxico en el suelo, esto se debe a que viven en íntimo contacto con el suelo, tienen una cutícula fina y permeable y consumen grandes volúmenes de suelo. Además se han utilizado en muchos estudios debido a su importancia en la cadena alimenticia terrestre, por su potencial para la acumulación de contaminantes y la facilidad de manipulación.

Apesar de la adaptabilidad que presenta esta especie de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado y la multiplicación de este organismo.

Este proyecto tiene la finalidad de presentar la importancia que tiene el efecto de las heces de gado bovino sobre los integrones de las heces de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) ya que gran parte de los efectos benéficos que las lombrices, aportan a las propiedades del suelo, se atribuye a sus actividades de alimentación e interacción con los microorganismos del suelo.

JUSTIFICACION

La pérdida de materia orgánica es un proceso que provoca degradación física en los suelos, la cual se refleja en un problema asociado con la estructura del suelo como, por ejemplo, disminución de la porosidad y mayor compactación.

La ganadería genera suficientes volúmenes de estiércol, los cuales son susceptibles de utilizarse para mejorar la fertilidad de los suelos y por ende mejorar la productividad de los mismos. El empleo del estiércol como enmiendas orgánicas no es posible sin que antes haya un proceso de estabilización ya que estos residuos, tienen algunas restricciones para el uso directo en la agricultura, por eso es necesario realizar procesos de composteo o la transformación de los mismos a través de la vermicomposta.

El humus de lombriz o vermicomposta posee ciertas características, contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina.

Algunos autores han comprobado que las lombrices (*Eisenia foetida*) acumulan en su cuerpo muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos, esto aunado a que en su intestino contiene una flora bacteriana muy diversa.

Las bacterias metabolizan el material orgánico degradado en el sistema digestivo de la lombriz, por medio de las enzimas que son específicas en el sustrato, a pesar de la adaptabilidad que presentan las especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado y la multiplicación de este organismo. Por lo tanto esta investigación puede contribuir al estudio de este tipo de especie de lombriz (*foetida*) con una especificidad de sustrato (heces de bovino) sobre los integrones de sus heces.

OBJETIVOS:

GENERAL

-Obtención y caracterización de los integrones de las heces de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) cuando son alimentadas con heces de ganado bovino.

ESPECIFICO

-Efecto del uso como sustrato las heces de ganado bovino sobre el crecimiento de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* con dos tratamientos de humectación agua potable y agua de pescado (estanque).

-Aislamiento de las cepas de heces de lombriz roja californiana mediante un medio selectivo.

-Extracción de DNA de las cepas seleccionadas.

-Ampliación de las 3 regiones del integrón.

-Análisis bioinformático de la región variable del integrón.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE PARTICIPACIÓN

El proyecto de investigación “Efecto del uso como sustrato las heces de ganado bovino sobre los integrones de la heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida*” se llevó acabo en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en la Carretera Panamericana Kilómetro 1080, colonia Terán, 29050, Chiapas, México, el croquis de ubicación de la institución se puede observar en la figura 1.

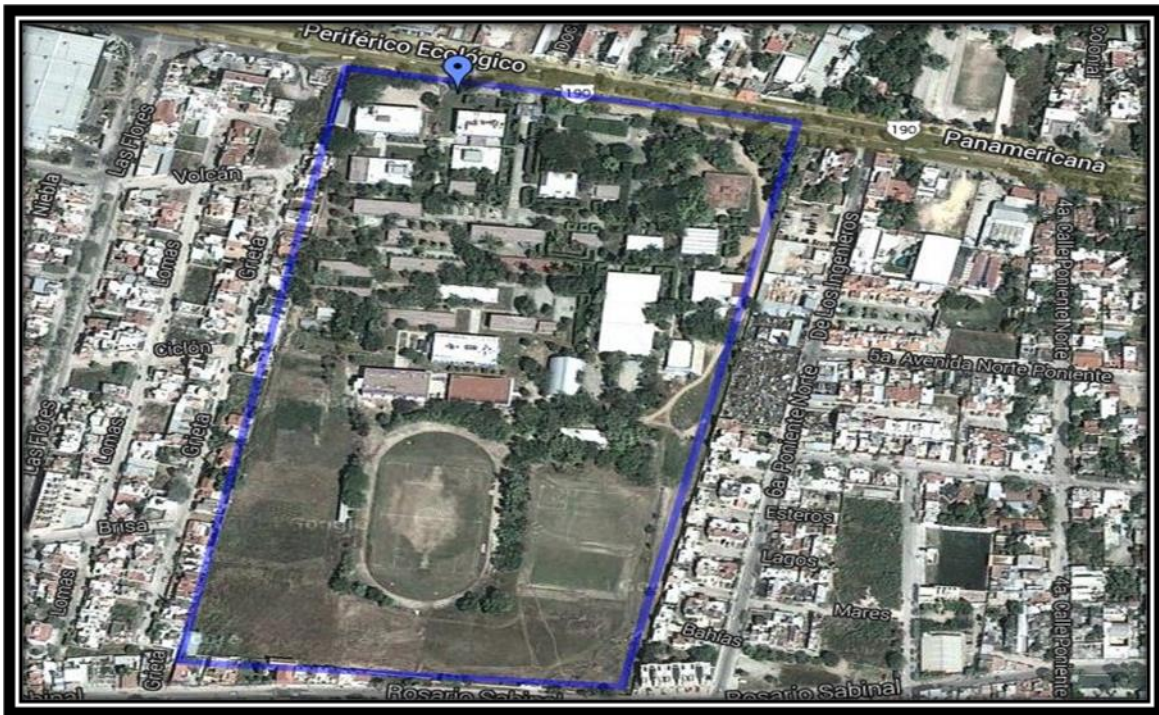


Figura 1.-Mapa de localización del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

PROBLEMAS A RESOLVER

México, se genera alrededor de 50,882 toneladas sobre materia seca al año de estiércol de ganado bovino (SAGARPA 2012), constituyéndose en un importante reservorio de contaminantes de mantos freáticos y del suelo al ocasionar un aumento en la concentración de nitratos (N-NO₃) lo cual con el paso del tiempo son inaccesibles a la vida silvestre; un tratamiento alternativo a este problema sería la vermicomposta para la biorremediación del suelo.

Las lombrices de la especie *foetida* acumulan muchos microcontaminantes orgánicos lipofílicos del entorno del suelo circundante, no sólo a través de la absorción pasiva de la fracción disuelta a través de la pared del cuerpo, sino también por captación intestinal durante el paso del suelo a través del intestino.

El efecto de las lombrices (*Eisenia foetida*) es probablemente indirecto, resultante de la actividad microbiana. Las lombrices pueden regular directamente la población de microorganismos por la gran cantidad que consumen de suelo. Esto conduce a eliminación de algunos microorganismos y proliferación de otros en el tracto digestivo, en la drilosfera y en las heces de las lombrices. En el intestino de la lombriz ocurren procesos de fraccionamiento, desdoblamiento, síntesis y enriquecimiento enzimáticos y microbianos, incrementando significativamente la velocidad de degradación y mineralización del residuo y la capacidad de eliminar microorganismo patógeno de plantas y animales.

Gran parte de los efectos benéficos que las lombrices del suelo aportan a las propiedades del suelo, se atribuye a sus actividades de alimentación e interacción con los microorganismos, debido a los diferentes sustratos que se utilizan como alimento, el producto final (lombricompuesto) posee características diferentes entre uno y otro. A partir de esto surge la interrogante de la investigación del efecto de las heces del ganado bovino sobre los integrones de las heces de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances.

La trascendencia de la investigación radica en dar a conocer sobre la importancia que tiene el efecto del uso de sustrato las heces de ganado bovino sobre los integrones de las heces de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) ya que a pesar de que esta especie se adapta a cualquier ambiente siempre y cuando sea favorable para ella, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente su estado y la multiplicación de este organismo.

Limitaciones:

Durante el desarrollo de la investigación se presentaron las siguientes limitaciones:

- Falta de materiales para la realización de la metodología.
- La falta del sustrato para el estudio de la lombriz.
- En cuanto a la extracción del DNA, la práctica para lograr una mejor extracción y obtener una confirmación de DNA de calidad.

CAPÍTULO 1.- FUNDAMENTO TEORICO

En México, han sido identificadas 129 especies de lombrices, de las cuales 46 son nativas, 47 son exóticas y 36 pertenecen a la familia de los *Megascolecidae*. Las lombrices intervienen en los sistemas de regulación biológica del suelo, tienen la capacidad de remover partículas y producir estructuras organominerales, llamadas estructuras biogénicas. Ellas también ayudan a mantener la estructura del suelo, a proceso de infiltración del agua y a regular la capacidad de asimilación de nutrientes por las plantas, incluyendo el nitrógeno (N) en su forma de amonio (NH₄⁺) y nitratos (NO₃⁻). *Eisenia foetida* ha demostrado ser la mejor en el procesamiento de residuos orgánicos, y se considera adecuada para la vermicomposta por su gran tolerancia a la temperatura.

La vermicomposta es un proceso aeróbico, biológico, termofílico de degradación y de estabilización de la materia orgánica bajo condiciones controladas. Durante el proceso los sustratos más lábiles de la materia orgánica (azúcares, aminoácidos, lípidos y celulosa) son descompuestos, bajo condiciones controladas, en menor tiempo por bacterias, hongos y actinomicetos mesófilos tolerantes a temperaturas medias. La proporción de esos microorganismos varía según el sustrato.

Posteriormente, se lleva a cabo la descomposición de los materiales más recalcitrantes (hemicelulosa y lignina) por organismos termófilos (resistentes a altas temperaturas) como las levaduras y algunos actinomicetos, las altas temperaturas (45 - 65 °C), durante la fase termofílica, causan la muerte efectiva de patógenos y semillas de malezas evitando que sean transferidos a cultivos sucesivos para pasar luego a la formación de sustancias húmicas, durante la fase de enfriamiento y maduración (Soto y Muñoz, 2002; Raviv, 2005).

1.1.-GENERALIDADES DE LA LOMBRIZ (*Eisenia foetida*)

Eisenia foetida es la lombriz roja californiana, se le conoce con éste nombre porque fue ahí donde comenzó a reproducirse de manera intensiva y se le detectaron las grandes bondades como un organismo capaz de generar un abono orgánico de excelente calidad, pero en realidad ésta lombriz es originaria de Eurasia, donde se encontraba confinada desde hace unos 10,000 años. *Eisenia foetida* pertenece al reino animal, tipo anélido, clase oligoqueto, orden opisthopro, familia Lumbricidae, género *Eisenia* y especie *foetida* (García, 2006).

La lombriz en mención es de color rojo oscuro, mide de 6 a 8 cm de largo y 3 a 5 milímetros de diámetro, respira por medio de su piel, puede pesar hasta 1.4 gramos, no soporta la luz solar, tiene una longevidad de 16 años y consume diariamente el equivalente a su peso, arrojando un producto de buena calidad, ya que incrementa 5 veces el contenido de nitrógeno, 7 veces el fósforo, 5 potasio y 2 de calcio del material que ingiere originalmente. Esta especie es hermafrodita incompleta, es decir presenta los dos órganos reproductores, por lo que requiere acoplarse entre dos, dando cada una un cocón o huevo y éste a su vez eclosionara de 2 a 20 lombrices por cocón dependiendo de su alimentación; produciendo 1300 lombrices por año una sola lombriz. Para alimentarse diariamente consume el equivalente a su peso (1.4 gramos). El 60 % de lo que ingiere es abono (Rodríguez, 2003).

1.2.-SISTEMA DIGESTIVO

El sistema digestivo comienza con la parte superior de la apertura bucal, en esta parte se sitúa el prostomio con forma de labio y las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que pasa posteriormente al esófago donde se localizan las glándulas calcíferas.

Estas glándulas segregan iones de calcio contribuyendo a la regulación del equilibrio ácido-básico, tendiendo a neutralizar los valores de pH. Posteriormente se encuentra el buche, en el cual el alimento queda retenido para dirigirse al intestino (Figura 2) (Mendoza, 2008).

Es importante mencionar, que la lombriz consume los alimentos por succión, no tiene dientes, de ahí la importancia de mantener bien húmedo el residuo orgánico a transformar. Su nivel de eficiencia es del 60%, es decir todos los días consume una cantidad de comida equivalente a su peso, excretando en forma de humus el 60% de la misma, el cual es rico en sustancias orgánicas, minerales, fitorreguladores y enzimas; el 40% restante es asimilado y utilizado por la lombriz para sus funciones vitales. Así un kilogramo de lombriz, consume un kilogramo de desecho orgánico al día (Rodríguez, 2010).

Además, la lombriz tiene una gran cantidad de proteína, aproximadamente 80% de su peso, con un excelente contenido de aminoácidos, puede ser usado como alimento de animales (Mendoza, 2008).

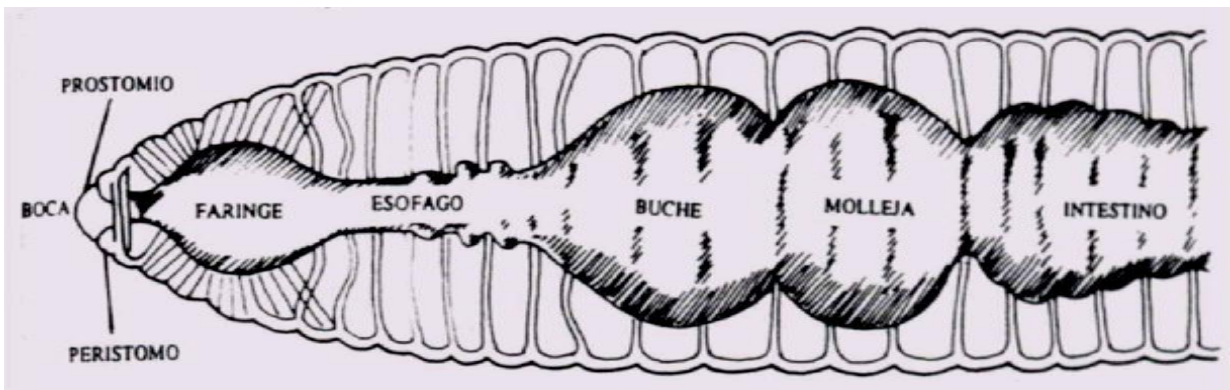


Figura 2.- Vista dorsal de estructuras internas de la lombriz de tierra (Tomado de Mendoza, 2008).

1.3.-USOS DE LAS LOMBRICES

Hoy en día existen diversas evidencias de que las lombrices de tierra provocan diferentes efectos benéficos, físicos, químicos y biológicos, sobre los suelos. Estos efectos se han atribuido al mejoramiento de las propiedades y la estructura del suelo, a una mayor disponibilidad de los elementos nutritivos para las plantas, y a una creciente población microbiana y metabolitos biológicamente activos, como los reguladores de crecimiento de la planta (Atiyeh *et al.*, 2002).

Las lombrices, durante el proceso de alimentación, fragmentan los residuos, incrementan la actividad microbiana y los índices de descomposición y/o mineralización de los residuos orgánicos, alteran las propiedades físicas y químicas de los materiales, provocando un efecto de composteo o humificación mediante el cual la materia orgánica inestable es oxidada y estabilizada. El producto final, comúnmente llamado vermicomposta.

El humus de lombriz o vermicomposta posee ciertas características tales como material de color oscuro, con un agradable olor a mantillo de bosque, su gran bioestabilidad evita su fermentación o putrefacción, contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, facilita su asimilación por las raíces e impide que estos sean lixiviados con el agua de riego manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo (Duran y Henríquez.,2009).

La acción de la lombriz produce un agregado notable de bacterias que actúan sobre los nutrientes macromoleculares, elevándolo a estados directamente asimilables por las plantas, lo cual se manifiesta en notables mejoras de las cualidades organolépticas de frutos y flores, y mayor resistencia a los agentes patógenos.

El humus de lombriz favorece la formación de micorrizas, acelera el desarrollo radicular y los procesos fisiológicos de brotación, floración, madurez, sabor y color. Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas al ataque de plagas y patógenos así como la resistencia a las heladas.

La acción del humus de lombriz hace asimilable para las plantas nutrientes como fósforo, calcio, potasio, magnesio, y también micro y oligoelementos, entre otras características la lombriz (*Eisenia foetida*) contribuye a la regulación del equilibrio ácido - básico, tendiendo a neutralizar los valores del pH del suelo; así como aumenta la resistencia de las plantas a las plagas, enfermedades y organismos patógenos, también puede incrementar la producción de frutas, hortalizas y otros productos agrícolas (Moreno, 2006).

Estas y otras particularidades inherentes al proceso digestivo de la lombriz, hacen que el producto por ella elaborado tenga una acción como enmienda, fertilizadora y fitosanitaria muy superior a un compost.

Debido a este enfoque, diversos investigadores han estudiado la utilización potencial de la vermicomposta, dentro de la industria agrícola y hortícola. Los procesos que involucran biomasa generan residuos orgánicos. De manera aproximada, los residuos orgánicos se pueden agrupar en cuatro categorías: los urbanos, los agroindustriales, los agropecuarios y los de los cuerpos de agua (Gómez, 2000).

Acosta y Brand, (1992), denominan “materias primas” a los materiales que se emplean para elaborar las pilas que van a servir de alimento a la lombriz y hacen una clasificación más genérica: de origen vegetal y origen animal.

Origen vegetal: En este caso se emplean las cáscaras de frutas y verduras, hojas, tallos de plantas arvenses, bagazo de caña, pencas y cáscaras de plátano, ramas y

hojas de toda clase, aserrín y virutas, broza de café y otros granos, caña de maíz (Acosta y Brand, 1992).

Origen animal: Generalmente se conocen como estiércoles. Se usan estiércoles de toda clase de animales, orines, huesos pulverizados, plumas de aves etc. Aquí no se incluye la gallinaza por ser un recurso que tiene mucho valor comercial y por qué además en el lecho produce gas metano que es letal para la lombriz (Acosta y Brand, 1992).

1.4.-ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO (HECES DE GANADO BOVINO)

El estiércol está constituido por las deyecciones de los animales mezclados, o con las sustancias que les sirven de lecho o cama (Acosta y Brand, 1992). La palabra estiércol se emplea para los desechos de todos los animales, aunque como regla general, la mayor parte del estiércol que moderadamente se coloca en el suelo está producido por el ganado Bovino.

El estiércol consta de dos componentes originarios, el sólido y el líquido, en una relación aproximada de 3 a 1. Por lo general, un poco más de la mitad del nitrógeno total, casi todo el fósforo en forma de ácido fosfórico y alrededor de dos quintos de potasio se hallan en el estiércol sólido.

Además del contenido de Nitrógeno, fósforo y potasio, el estiércol contiene también calcio, magnesio, azufre y probablemente todos los oligoelementos, estos últimos de gran importancia. En algunos casos para mantener el equilibrio de la condición de los nutrientes en los suelos tratados con estiércol. (Buckman *et al*, 1997, citado por Parra, 2008).

1.5.-FACTORES IMPORTANTES PARA EL MANEJO DEL SUSTRATO

Humedad. La humedad es un factor de mucha importancia que influye en la reproducción. Debe estar entre el 70 y 80%. Una humedad superior al 85% hace que las lombrices entren en un período de latencia y se afecta la producción de vermicomposta y la reproducción. Debajo de 70% de humedad es una condición desfavorable. Niveles de humedad inferiores al 55% son mortales para las lombrices.

Temperatura. La temperatura es otro de los factores que influyen en la reproducción, producción (vermicomposta) y fecundidad de las cápsulas. Una temperatura entre 18 a 25°C es considerada óptima, que conlleva el máximo rendimiento de las lombrices. Cuando la temperatura desciende por debajo de 15°C las lombrices entran en un período de latencia, disminuyendo su actividad. Van dejando de reproducirse, crecer y producir vermicomposta; los cocones (huevos) no eclosionan y pasan más tiempo encerrados los embriones, hasta que se presentan condiciones favorables.

PH. Mide lo alcalino o ácido del sustrato. La lombriz acepta sustratos con pH de 5 a 8.4, que podemos controlar mediante un pH-metro o un simple papel indicador. Fuera de esta escala, la lombriz entra en una etapa de latencia. La preparación del sustrato debe hacerse mediante fermentación aeróbica. Esta fermentación es el resultado de la actividad de una serie de microorganismos de diferentes grupos. El tiempo que dure la fermentación depende del pH, humedad, temperatura y tipo de sustrato (Olivares et al., 2012).

Las lombrices son consumidores voraces de residuos orgánicos y aun cuando sólo utilizan una pequeña porción para la síntesis de sus cuerpos, ellas excretan una gran parte de los residuos consumidos en una forma medio digerida.

Puesto que los intestinos de las lombrices contienen una amplia gama de microorganismos, enzimas, hormonas, etc., éstos materiales medio digeridos se

descomponen rápidamente y son transformados a una forma de vermicomposta en un período de tiempo corto (Ghosh *et al.*, 1999).

1.6.-ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO A NIVEL CELULAR ENTRE LOMBRIZ- BACTERIA

La gran mayoría de los invertebrados del suelo no parece poseer enzimas (proteasa, celulosa, mannanasa, fosfomonesterasa, xilanasas, etc.), para actuar directamente en la celulosa, lignina, taninos y algunos complejos húmicos. Las enzimas presentes en los microorganismos contribuyen en la degradación de estos compuestos en el tracto digestivo de las lombrices de tierra (Lavelle *et al.*, 1995; Flegel and Schrade, 2000). Las secreciones exocrinas producidas por la lombriz consisten en una mezcla acuosa de agua, iones, enzimas y mucus (Barois, 1992; Lattaud *et al.*, 1998).

Las bacterias metabolizan el material orgánico degradado en el sistema digestivo de la lombriz, por medio de las enzimas que son específicas en el sustrato: las proteasas catabolizan las proteínas, la amilasa hidroliza el almidón; la xilanasas degrada el material vegetal (el xileno) y las celulasas rompen los enlaces de la celulosa. Las enzimas influyen en la liberación específica de nutrientes y en la calidad del alimento para ser asimilado en el cuerpo de la lombriz (Flegel y Schrade, 2000).

Zhang *et al.*, (2000) estudiaron algunas moléculas que son producidas en la descomposición orgánica en el sistema digestivo de *Metaphire guillelmi* y *Eisenia foetida*, tales como azúcar, proteínas, así como las actividades de las enzimas celulasas, proteasas, fosfatasa y la hemicelulasas. Estas son sustancias que pertenecen a los residuos parcialmente hidrolizados, son principalmente celulosa,

hemicelulosa, lignina, sustancias sintetizadas nuevamente por los microorganismos y células microbianas.

Saavedra et al., 2006, analizaron la biodegradación de compuestos fenólicos por *Eisenia foetida* en desechos orgánicos de una industria de aceite de oliva. Esta redujo un 90% de compuestos fenólicos a través de la actividad de las enzimas lacasa y peroxidasa. Además se detectó incremento en la actividad de la deshidrogenasa y la β -glucosidasa, por lo que se puede indicar que es responsable también de la oxidación de compuestos fenólicos, carbono orgánico y ácido húmico; así como del incremento en el contenido de nitrógeno y fósforo durante la degradación de la basura industrial.

La literatura menciona que a pesar de la adaptabilidad que presentan las especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado y la multiplicación de este organismo. Gran parte de los efectos benéficos que las lombrices, aportan a las propiedades del suelo, se atribuye a sus actividades de alimentación e interacción con los microorganismos del suelo, su patrón de consumo implica la ruptura e incorporación de grandes cantidades de suelo (parte mineral y materia orgánica) ya que contiene una variedad de microorganismos, síntesis y enriquecimiento enzimático y microbiano, incremento significativamente a la velocidad de degradación y mineralización del residuo y la capacidad de eliminar microorganismos patógenos de plantas y animales (Flegel and Schrade , 2000).

Los microorganismos patógenos causan enfermedades a personas, animales y plantas, los problemas que causa una infección dependen del tipo de patógeno, el modo en que se transfiere, dosis o concentración de patógenos, persistencia de los microorganismos y la resistencia de este a un antibiótico.

La presencia de integrones en numerosas bacterias justifica la grandísima diseminación de genes de resistencia que se han observado en los últimos años (Pérez, 2012).

1.7.- ¿QUE SON LOS INTEGRONES?

Un integrón es un elemento genético dinámico, que codifica para una integrasa con actividad de recombinación sitio específico y acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Estos elementos genéticos son considerados sistemas de expresión, debido a que son capaces de integrar y expresar genes denominados casetes; estos cassettes proporcionan resistencia a la mayoría de las clases de antibióticos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, la fosfomicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de amonio cuaternario (Pérez, 2012).

En los integrones clase 1 detectados en enterobacterias de origen nosocomial se han descrito la prevalencia de tres tipos de regiones de DNA, con tamaños que oscilan entre 800, 1000 y 1500 pb.

Las enterobacterias (orden Enterobacteriales y única familia Enterobacteriaceae) son bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos.

Los integrones estructuralmente están formados por tres elementos necesarios para la captura de genes, uno que codifica la integrasa, el otro es un lugar de recombinación sitio específico y por último un promotor para la expresión de los genes insertados (Hall and Collis, 1995).

1.8.-AMPLIFICACION DEL DNA

Tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad y hacer investigación científica sobre el DNA amplificado (SAIKI, 1988).

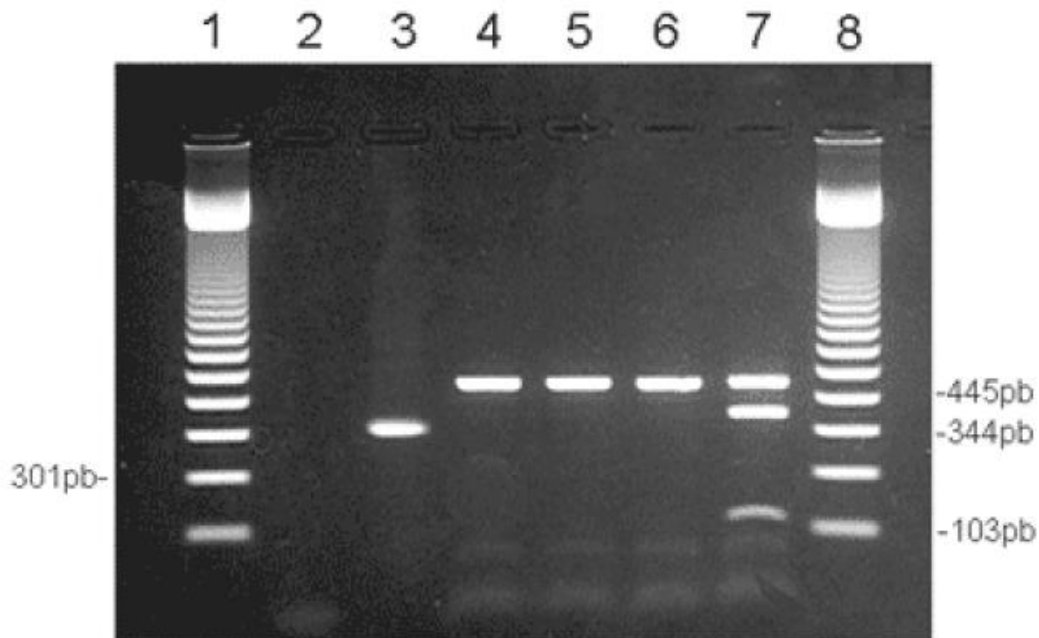


Figura 3.- Amplificación del DNA por PCR (tomado de Rodicio et al, 2004)

El DNA contiene toda la información genética que define la estructura y la función de un organismo. Durante la replicación, un ácido nucleico bicatenario se duplica para formar copias idénticas. Con este proceso se perpetúa la información genética. Durante la transcripción, un segmento de DNA que constituye un gen, se lee y se transcribe en una secuencia monocatenaria de ARN.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas (Hoffman et al, 1987).

Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de DNA extraído de un cultivo puro de la bacteria.

Para la extracción del DNA bacteriano existen protocolos generales, pero pueden requerirse modificaciones, dependiendo de la bacteria. Además, la amplificación también puede conseguirse directamente a partir de una colonia aislada o un cultivo líquido de la bacteria de interés, o incluso a partir de una muestra clínica, simplificando significativamente la identificación.

Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio et al, 2004).

CAPÍTULO 2.-METODOLOGIA:

ANALISIS FISICO-QUIMICOS DEL SUELO

pH

Material y Equipo

- Muestra del suelo
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados de 25 ml
- Pipeta de 10 ml
- Piceta con agua destilada
- Potenciómetro
- Solución amortiguadora de pH 7 y 4
- Agitador magnético

Procedimiento:

1. Pesar 1grs de suelo y colocarlo en un vaso de precipitado de 25 ml.
2. Agregar 10 ml de agua destilada.
3. Agitar y dejar reposar 10 minutos.
4. Ajustar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras.
5. Pasados 10 minutos, medir el pH.

Categoría	Valor pH
Fuertemente acido	< 5.0
Moderadamente Acido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	8.5

Cuadro 1.- Datos comparativos de pH (Olivares et al., 2012).

HUMEDAD

Fundamento: La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda, y después de haberse secado en la estufa, hasta tener peso constante.

Material y Equipo

- Balanza analítica
- Estufa
- Desecador
- 15 grs de suelo

Procedimiento:

1. Pesar 15 grs de muestra tamizada sobre una charola de aluminio a peso constante.
2. Colocar la muestra dentro de la estufa a 105°C de 12 a 24 hrs.
3. Sacar la muestra de la estufa y colocarla dentro de un desecador.
4. Pesar la muestra con todo papel
5. Calcular los porcentajes de humedad en el suelo por diferencia de peso.

$$\% \text{ de Humedad del suelo} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}}$$

CONDUCTIVIDAD ELECTRICA

Materia y Equipo:

- Muestra de suelo seco
- Balanza analítica
- Vaso de precipitado de 100 ml
- Bureta
- Espátula
- Papel filtro
- Embudo buchner
- Matraz de Kitazato
- Piceta con agua destilada
- Bomba al vacío
- Probeta
- Conductrimetro
- Agua destilada
- Matraz aforado de 100 ml

Soluciones:

- Solución estándar de cloruro de potasio (KCl) 0.1N. Disolver 0.7455 grs de KCl en agua destilada y aforar a 100ml.
- Solución estándar de cloruro de potasio 0.01N. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución estándar de KCl 0.1N y aforar a 100 ml.

Procedimiento:

1. Preparación de la pasta de saturación.
2. Pesar 40 grs de suelo seco y colocarlo en un recipiente de plástico. Si el suelo es arenoso pesar 600 grs.
3. Agregar agua destilada con la bureta y mezclar con la espátula hasta saturación.

4. Golpear el recipiente con cuidado sobre la mesa de trabajo para asentar el suelo.
5. La pasta estará lista cuando se observe un brillo en la superficie (formación de espejo) esto no sucede con el caso de suelos con alto contenido de arcilla.
6. Anotar el volumen de agua gastado (ml)
7. Dejar reposar la pasta durante una hora y comprobar a criterio su saturación.
8. Tapar el recipiente y dejarlo reposar por 3 horas, excepto suelos arcillosos que deben dejar reposar 24 horas.

Obtención del extracto del suelo.

1. Colocar papel filtro sobre el embudo, humedecerlo con agua destilada dejando drenar el exceso y conectar el sistema de filtración al vacío.
2. Mezclar nuevamente la pasta y colocarla en el embudo y aplicar vacío.
3. Obtener un extracto de aproximadamente 50 ml.

Determinación de la conductividad eléctrica

1. Calibrar el conductímetro con las soluciones de KCl 0.1 y 0.01 N antes mencionadas.

Categoría del suelo	Valor (mmhos/cm o ds/m ⁻¹)
No salino	0-2.0
Poco salino	2.1 – 4.0
Moderadamente salino	4.1 -8.0
Muy salino	8.1- 16-0
Extremadamente salino	>16

Cuadro 2.- Datos comparativos de conductividad eléctrica (Norma Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2008).

TEXTURA

Material y Equipo:

- Balanza analítica
- Batidora
- Probeta de 1L
- Densímetro
- Termómetro
- 50 grs de suelo

Procedimiento:

1. Pesar 50 grs de suelo y agregar un poco de agua en el vaso de una batidora, agregar 10 ml del dispersante hexametaforato de sodio (concentración 50 grs/L). Agitar por 10 minutos.
2. Colocarlo en una probeta y aforarlo con agua destilada. Agitar 1 minuto para homogenizar (aproximadamente 10 veces).
3. Tomar la primera lectura después de los 40 segundos con el densímetro y la temperatura con el termómetro.
4. Dejar reposar 2 horas y tomar la segunda lectura y la temperatura.

Formula:

$$\% \text{ Limos} + \% \text{ arcillas} = \frac{1^{\text{era}} \text{ lectura} + (T1 - 20) 0.36}{\text{Peso del suelo}}$$

$$\% \text{ Arcillas} = \frac{(2^{\text{da}} \text{ lectura} + (T2 - 20) 0.36)}{\text{Peso del suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ limos} + \% \text{ arcillas})$$

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

Material y Equipo:

- 25 grs de suelo
- Embudo
- Papel filtro
- Agua destilada
- Papel aluminio

1. Pesar 25 grs de suelo, colocarlo en un embudo con papel filtro whatman y taparlo y agregar 25 ml de agua destilada, tapar el embudo con papel aluminio para evitar la evaporación
2. Pesar después de 24 hrs.

$\frac{H_2O}{GRS \text{ DE SUELO}} = \frac{\text{peso drenado} - \text{peso del suelo seco (105}^\circ\text{C)} - \text{peso blanco del suelo húmedo}}{\text{peso del suelo seco (105}^\circ\text{C)}}$

VERMICOMPOSTA

Procedimiento:

La lombriz *Eisenia foetida* se crío en una cama de suelo el cual estaba compuesto por: 50% de estiércol de ganado bovino y un 50% de bagazo de caña en el cual se adicionaron 20 lombrices. Se manejó a temperatura ambiente con una humedad del 80% aproximadamente. La frecuencia de alimentación fue a cada 15 días y la frecuencia de riego fue a cada 7 días con agua de pescado (estanque) y otra con agua potable.

Las mediciones de la lombriz se realizaron cada 15 días a las cuales se le tomo medida con el vernier tanto la longitud como el diámetro.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO (LIQUIDO) PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO

LB: medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano. El NaCl aporta la concentración salina necesaria para mantener un nivel osmótico apropiado para el buen desarrollo de los microorganismos.

Fórmula:

Reactivo	1000 ml	400 ml
Peptona	10 grs	4 grs
NaCl	10 grs	4 grs
Extracto de levadura	5 grs	2 grs

Preparación de medio líquido en tubo (caldo).

1. Pesar y rehidratar el medio.
2. Distribuirlo con una pipeta en los tubos (5 ml)
3. Esteriliza en autoclave

4. Sacar los tubos de la autoclave y dejar enfriar.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA

Obtención de las heces fecales de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) para el aislamiento de las bacterias:

A los 45 días de crecimiento de la lombriz:

1. Se tomaron 10 lombrices de la vermicomposta.
2. Una vez extraídas las lombrices se limpiaron, se colocaron en una caja Petri con papel filtro en el cual excretaría sus heces fecales.
3. Después se prepararon cultivos en suspensión con heces de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) con 5 ml de caldo LB, el medio de concentración que se manejó de NaCl fue al 6%, NaCl al 6% con un pH de 5% y el otro fue a la misma concentración pero con un pH 9 en medio líquido y en placa al cual se adicionaron los siguientes antibióticos “trimetropima con una concentración de 5µl y ciprofloxacino 5µl”, incubándolos a 28°C, medios líquidos con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h.

MEDIO DE CULTIVO SOLIDO (AGAR BASE ROJO FENOL)

Preparación de un medio sólido en placa.

Formula:

Reactivos	1 Litro	800 ml
Peptona	10 grs	8 grs
NaCl	5 grs	4 grs
Agar	15 grs	12 grs
Rojo fenol	0.018 grs	0.144

1. Pesar la cantidad de medio y rehidratarlo con agua destilada en una botella.
2. Esterilizar en autoclave la botella sin cerrar totalmente el tapón de rosca.
3. Sacar del autoclave, enroscar del todo el tapón e introducir la botella en un baño a 40°C al menos durante 30 minutos.
4. Distribuir el medio en las placas de Petri que están estériles dentro de una campana de flujo laminar o en las proximidades del mechero, flameando bien la boca de la botella para evitar las contaminaciones.
5. Dejar que el medio solidifique.

De los cultivos en suspensión se prepararon diluciones para sembrar en cajas Petri y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 hr.

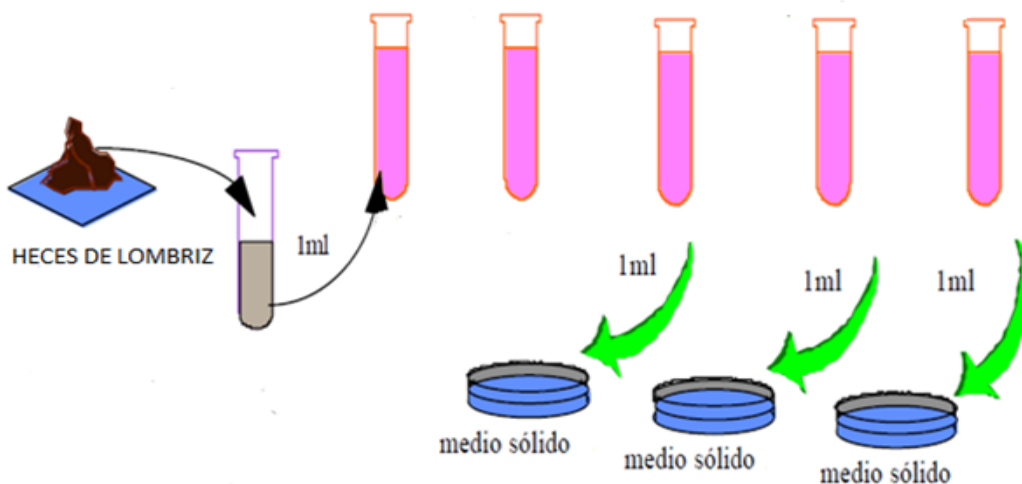


Figura 4.- Muestra el proceso de aislar las bacterias a partir de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* en medio de cultivo líquido (LB) para después sembrar en placa.

Después de este paso, se volvió a resembrar en agar base rojo fenol en estría cruzada y estría masiva.

TECNICA ESTRIA CRUSADA

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri. El objetivo es obtener, a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Cada una de estas bacterias originará una colonia.

Procedimiento:

1. Esterilizar el asa y enfriarla en las proximidades del mechero.
2. Tomar el inóculo.
3. Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extenderlo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
4. Flamear el asa y enfriarla. Rozar una vez con el asa las estrías sembradas la primera vez y realizar sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías que no toque la primera.
5. Flamear y enfriar el asa. Repetir la operación descrita en el apartado anterior, pero rozando al empezar la segunda tanda de estrías.
6. Flamear el asa y cerrar la placa e incubar a 37°C.



Figura 5.- Muestra los pasos llevados a cabo para hacer la estria cruzada en placa.

TECNICA ESTRIA MASIVA.

Procedimiento:

1. Esterilizar el asa y enfriarla en las proximidades del mechero.
2. Tomar el inóculo.
3. Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extenderlo formando estrías muy juntas sobre la superficie de la placa.
4. Flamear el asa y cerrar la placa e incubar a 37°C.



Figura 6.- Muestra el extendido que se hizo con el inóculo para formar la estria masiva en la placa.

ANALISIS MACROSCOPICO DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Para el análisis macroscópico de las cepas aisladas en medio de cultivo sólido “agar base rojo fenol” en placas Petri, incubadas a temperatura ambiente, durante 24 horas, se determinaron las siguientes características: tamaño, forma, borde, color y elevación.

ANALISIS MICROSCOPICOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Tinción de gram que su fundamento consiste en:

Es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo.

El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.

El método de tinción de Gram es el siguiente:

1. Se prepara el frotis tomando con el haza el inóculo después se frota en el cubreobjetos, se seca y se fija.
2. Se cubre con cristal violeta durante un minuto.
3. Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Se traza con lugol un minuto. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Se gotea alcohol-acetona de forma continua hasta que la preparación deje de perder color y se lava enseguida con agua abundante.

7. Se cubre la preparación con un colorante de contraste, como la safranina, durante un minuto.
8. Se lava con agua y se seca al aire, observándose a continuación con el objetivo de inmersión. El análisis se observó al microscopio en el objetivo 100X.

OBTENCIÓN DE LAS BACTERIAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA

En la caja Petri donde se encontraba el cultivo se adiciono 5 ml de agua estéril y después se tomó 1µl de la muestra y se agregó al tubo eppendorf anteriormente mencionado y se mantuvo en refrigeración por 24 hr a una temperatura de -20°C hasta su uso.

EXTRACCIÓN DEL DNA

Se cultivaron las cepas en el agar durante 24 horas a temperatura ambiente, después a la muestra se le agrego 5µl de agua estéril y se tomó un 1µl del medio de cultivo.

El aislamiento de DNA genómico de bacterias se basa en la liberación eficiente del DNA genómico por un buffer de lisis. Después se separó el DNA genómico de proteínas, polisacáridos y lípidos mediante una única fase de partición; a continuación se describe llevada a cabo en el proceso:

LISIS ENZIMÁTICA

1.- Al suelo lavado adicionar 1 ml de buffer para lisozima y 40µl de lizocima 10 mg/ml.

2.- Adicionar 1 ml de SDS 10% y 0.5 grs de arena estéril. Agitar en vortex durante 15 min.

3.- Centrifugar a 13000 rpm a una temperatura de 26°C por 10 min y transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.

ELIMINACION DE PROTEINAS Y PURIFICACION DE DNA

1.- Agregar 200µl del volumen de EDTA 0.5 M pH 8 y del volumen final, 120µl de acetato de potasio 5 M, pH 5.

2.- Incubar 30 min a 4°C.

3.-Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 10 min. Transferir 500µl del sobrenadante (que contiene el DNA) a un tubo nuevo.

4.-Hacer extracción con 400µl de la solución cloroformo: alcohol-isoamílico 24:1, agitar en vortex a la máxima velocidad.

5.-Centrifugar 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (25°C). Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

Nota: la fase acuosa es la capa superior. Por ningún motivo pasar la fase acuosa orgánica o las proteínas se puede usar micro pipeta de 200µl para mejor control. Si te llegas a traer fase orgánica, regresar y volver a centrifugar.

6.- Repetir los pasos 4 y 5.

7.- Precipitar el DNA de la fase acuosa de la segunda extracción con cloroformo agregando un volumen PEG al 13 % y agitar en vortex.

8.- incubar a 20°C toda la noche.

9.-Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 10 min, eliminar sobrenadante por decantación.

10.- Lavar la pastilla con 500µl de etanol 70% frío. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 10 minutos, eliminar sobrenadante por decantación.

11.- Dar un “spin” en la micro centrifugadora para bajar el etanol de las paredes del tubo y con una micro pipeta de 200µl quitar el exceso de etanol.

12.- Dejar secar la pastilla (aproximadamente 10 minutos) y resuspender en 50µl de agua estéril.

CONFIRMACIÓN DE LA CALIDAD DE EXTRACCIÓN DEL DNA (ELECTROFORESIS)

PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA

- a)** Preparar la bandeja (donde se formará el gel) con el(los) peine(s) apropiado(s) para añadirle la agarosa fundida. Colocarla en una superficie horizontal y poner cinta aislante por la parte anterior y posterior para evitar que se derrame el gel. Comprobar que los dientes del(los) peine(s) no llegan a tocar la bandeja (en caso de hacerlo, las muestras se perderían al ser aplicadas en los pocillos “sin fondo”).
- b)** Preparar la solución del gel de agarosa al 0.8% en un frasco de vidrio de 100 ml. Para ello, añadir las cantidades de agarosa y solución amortiguadora TAE indicadas en el anexo, tapar el frasco y calentar en microondas).
- c)** Vigilar constantemente para que no se salga la solución (al hervir demasiado). Se recomienda emplear una potencia intermedia. Puede agitarse suavemente de vez en cuando para realizar una fusión más uniforme.
- d)** Retirar el frasco con el gel fundido del microondas y dejar enfriar un poco.

- e)** Una vez solidificado el gel, retirar el(los) peine(s) y las cintas adhesivas (en su caso) y colocar la bandeja sobre la cubeta de electroforesis.

- f)** Rellenar la cubeta de electroforesis con el electrolito de cubeta (TBE 1X) hasta que el gel quede sumergido completamente.

- g)** En el primer pozo del gel se agrega 3 μ l de marcador el cual sirve como regla para medir cuánto pesa de muestra.

- h)** En los demás pozos agregamos 3 μ l de muestra y 1 μ l de buffer de carga.

- i)** El gel de electroforesis para el DNA genómico se correrá por 60 minutos a 80V.

2.1.- RESULTADOS

2.1.1.-ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LA VERMICOMPOSTA (CON HECES DE GANADO BOVINO).

pH.- Datos obtenidos a partir del análisis de pH en 2 tratamientos

	Agua pescado (estanque)	Agua Potable
VERMICOMPOSTA	7.12	7.14

Cuadro 3.- Datos de diferenciación de pH en los dos tratamientos del análisis de la vermicomposta.

Como resultado de la concentración de iones presentes en la vermicomposta obtuvimos que para el tratamiento con agua de pescado (estanque) esta presenta un pH de 7.12 a comparación del tratamiento con agua potable que presenta una concentración de iones de 7.14 lo que significa que esta entre el rango de un pH neutro como podemos observar en la cuadro 1 de datos comparativos de pH.

Discusión:

Duran y Henríquez, 2009 reportan que el pH del sustrato es un indicador determinante para el normal desarrollo de las lombrices dentro del sustrato, ya que la lombriz acepta sustratos con pH de 5 a 8.4 fuera de esta escala, la lombriz entra en una etapa de latencia lo que significa la muerte de este organismo.

Por lo tanto los resultados arrojados nos indica que la vermicomposta se encuentra a un pH óptimo para la sobrevivencia y producción de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

HUMEDAD

El suelo es un sistema heterogéneo y poroso, compuesto por partículas muy pequeñas e independientes, cuyo arreglo determina el volumen del espacio poroso, en el cual se transmite o se retienen el agua y el aire.

Olivares et al, 2012, encontraron que los niveles de humedad del suelo determinan el momento del riego por otra parte también menciona que la humedad es un factor de mucha importancia que influye en la reproducción de la lombriz y que debe estar entre el 70 y 80%. Si la humedad baja por debajo de 45%, disminuye la actividad microbiana, sin dar tiempo a que se completen todas las fases de degradación, causando que el producto obtenido sea biológicamente inestable, una humedad superior al 85% hace que las lombrices entren en un período de latencia y se afecta la producción de vermicomposta y la reproducción.

Por lo tanto la humedad que presento la vermicomposta en este estudio fue del 74.28% lo que indica que se encuentra en el rango óptimo para el desarrollo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

En relación a la humedad del suelo, es importante conocer no solo la cantidad de agua presente en el suelo, sino también su potencial o la fuerza con la que está retenida por las partículas del suelo.

CONDUCTIVIDAD ELECTRICA:

Datos obtenidos a partir del analisis de conductividad electrica de la vermicomposta

	Agua Potable	Agua de pescado (estanque)
VERMICOMPOSTA	7.69 dSm ⁻¹	7.72 dSm ⁻¹

Cuadro 4.- Diferenciacion del analisis de conductividad electrica en los 2 tratamiento de humectacion de la vermicomposta.

Todos los suelos fértiles contienen por lo menos pequeñas cantidades de sales solubles. La acumulación de sales solubles en el suelo se atribuye principalmente a problemas de drenaje de riego continuos, seguidos de evaporación y sequía.

Olivares et al, 2012, reportan que cuando se presenta una cantidad excesiva de sales en el suelo impide la absorción del agua hacia la planta y modifica la adsorción de nutrientes. La conductividad eléctrica permite estimar el grado de salinidad del suelo, en la vermicomposta se requiere que esté libre de sales por que puede resultar toxica cuando se adiciona al suelo.

La conductividad eléctrica es un parámetro que se encuentra regulado en la Norma Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2008, establece valores $\leq 4 \text{ dSm}^{-1}$.

Discusión

En relación con la norma NMX-FF-109-SCFI-2008, el resultado que se obtuvo con el tratamiento de agua potable fue de 7.69 dSm^{-1} y para el tratamiento con agua de pescado (estanque) fue de 7.72 dSm^{-1} lo que indica que el suelo es moderadamente salino como podemos observar en el cuadro 2 de datos comparativos de conductividad eléctrica.

Los dos tratamientos tuvieron una diferencia del 0.03 probablemente se debió a la composición química del tratamiento de humectación o la posible lixiviación de las sales durante el proceso.

TEXTURA

Determinación de la textura por el tacto:

Se evaluó comprimiendo la muestra la cual al presionarla se formó una cinta pero no tan largo, presento un tacto suave, algo pegajoso y fácil de manejar.

Determinacion de textura analiticamente:

La textura del suelo es la proporción en la que se encuentran distribuidas las partículas elementales que pueden conformar un sustrato. Según sea el tamaño, porosidad o absorción del agua en la partícula del suelo o sustrato. Como podemos observar en (Anexo 1) el suelo de la vermicomposta tiene un 20% de arena, 36.96% de arcilla y un 40% de limo.

El primer registro de temperatura fue de 25°C, según el cuadro de corrección de la temperatura regido por la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.Método AS-09 será: 1.98.

CUADRO DE CORRECCION POR TEMPERATURA			
TEMP. °C	CORRECCION	TEMP.°C	CORRECCION
18.0	0.54	24.5	1.80
18.5	0.36	25.0	1.98
19.0	0.18	25.5	2.15
19.5	0	26.0	2.34
20.0	0.18	26.5	2.52
20.5	0.36	27.0	2.70
21.0	0.54	27.5	2.858

Cuadro 5.-Datos de corrección por temperatura (Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.Método AS-09).

Discusión:

Peralta, 1995 reporta que la textura del suelo es clave en la comprensión para la adsorción y la distribución de los microorganismos en dicho medio. Si bien se considera que las arcillas son las principales responsables de la capacidad de adsorción bacteriana que presentan los suelos; cuanto más arcilla, más capacidad de retención del agua y elementos nutritivos habrá para el desarrollo y proliferación de los microorganismos que ayudan a la regeneración del suelo.

En relación a los resultados, la textura que presenta el suelo de la vermicomposta es apto para el desarrollo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) ya que la lombriz se alimenta succionando los nutrientes del suelo, lo cual necesita de un suelo que tenga la capacidad necesaria de absorción y distribución de los microorganismos en dicha vermicomposta.

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

Cantidad de muestra = 25 grs.

Volumen de agua inicial = 25 ml

Para el volumen de agua no retenida se midió con una probeta el cual arrojo como dato 16.5 ml de agua no retenida por la muestra, ya que nuestro volumen inicial fue de 25 ml, por lo tanto la diferencia entre el volumen inicial y el volumen de agua no retenido por la muestra da como resultado la capacidad de retención de agua del suelo.

Volumen retenido por la muestra es = 8.5 ml = 34% de capacidad de retención de agua de la vermicomposta.

Discusión:

La capacidad de retención de agua disponible (CRAD) es el intervalo de humedad disponible que se define como el agua del suelo que puede ser absorbida a un ritmo adecuado para permitir el crecimiento normal de las plantas.

La capacidad de retención de agua del suelo en un lugar particular depende de la profundidad del suelo, el volumen de los poros o espacios y la proporción de los vacíos que retienen agua contra el empuje de la fuerza de gravedad.

Burt, 2004 menciona que la alta cantidad de materia orgánica, ayuda a que los índices de retención de agua aumentan considerablemente. Según la apreciación de la capacidad de retención de agua en el suelo se puede definir según los siguientes parámetros 40-50% optima, 30-40% buena, 25-30 satisfactoria.

En relación a esto se puede decir que la capacidad de retención de agua de la vermicomposta elaborada con un 50% de heces de ganado bovino y un 50 % de bagazo de caña es buena ya que se encuentra en el rango del 30-40% de su capacidad de retención.

2.1.2.- AISLAMIENTOS DE LA BACTERIA DEL TRACTO DIGESTIVO DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA *Eisenia foetida*

El aislamiento de las bacterias de *E. foetida* se realizó a partir de lombrices provenientes de una lombricomposta elaborada con un 50% de estiércol de ganado bovino y un 50% de bagazo de caña, las cuales tuvieron dos tipos de riego una con agua potable y la otra con agua de pescado (estanque). Las bacterias se obtuvieron a partir de la defecación de las lombrices, las cuales después fueron inoculadas en tubos de ensaye en medio de crecimiento líquido (LB) por replica (Anexo 2).

El medio de concentración que se manejó de NaCl fue al 6%, NaCl al 6% con un pH de 5% (Anexo 3 -4) en el cual hubo variación de crecimiento y el otro fue a la misma concentración pero con un pH 9 en medio líquido y en placa al cual fue enriquecido con los siguiente antibióticos: trimetropima con una concentración de 5µl y ciprofloxacino 5µl, con la finalidad de lograr amplificar las células que portan el plásmido, esto se debe a la acción inhibidora del antibiótico sobre la síntesis de proteína y por ello sobre la replicación del cromosoma bacteriano, teniendo como resultado positivo en medio de cultivo líquido y en medio de cultivo solido (agar) con el antibiótico ciprofloxacino (Anexo 5) a excepción de la muestra 43 que tuvo como resultado negativo en placa probablemente se deba a la acción inhibitoria del antibiótico sobre las bacterias presentes en esa placa; a comparación del antibiótico trimetoprima (Anexo 6) que tuvo como resultado positivo tanto en tubo así como en placa.

2.1.3.-ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE BACTERIAS AISLADAS

Observaciones macroscópicas del medio de cultivo

El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permite identificar las bacterias por que las distintas especies forman a menudo colonias con forma, tamaño, color y aspecto característico. En el examen macroscópico se observó forma circular, con una elevación convexa, color crema, borde redondeado y olor pronunciado “fétido” (Anexo13).

Para el análisis microscópico se realizó la prueba de Gram (Anexo 7), donde se puede observar las muestras que tuvieron bacterias gram positivas y negativas, lo cual se basó en el siguiente fundamento propuesto por **Christian Gram** (1853-1938) el cual consiste en: la diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona; la capa de peptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el contrario, las Grampositivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

Bergey et al, 1994 informa que las diferencias en el tamaño, forma y ciertos detalles estructurales son características de los principales grupos de bacterias, y proporcionan las bases fundamentales para su estudio sistemático e identificación.

Durante la observación al microscopio se observó las siguientes formas bacterianas:

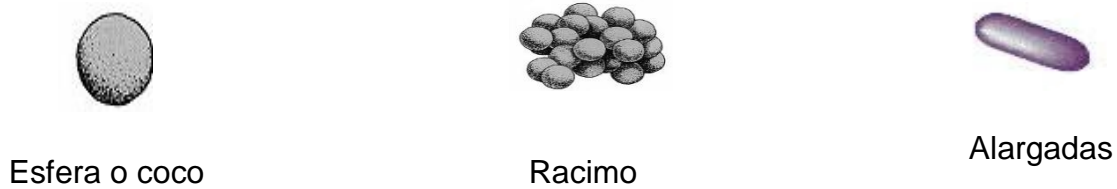
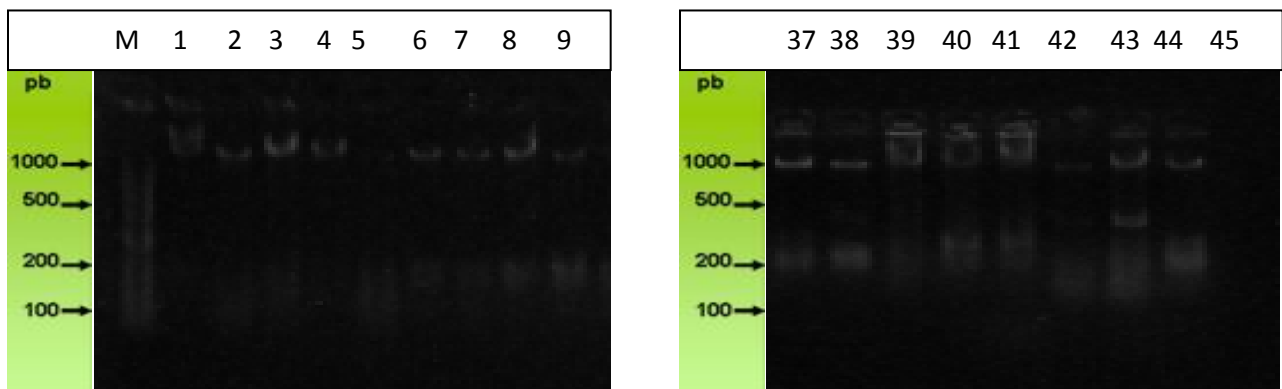


Figura 7.-Morfología que se observaron durante el análisis microscópico de la tinción de Gram

Tinción de gram se realizó con el objetivo de saber la morfología y una aproximación a la diferenciación bacteriana presentes en las muestras con 2 tratamientos de riego “agua potable y agua de pescado (estanque)” con una especificidad de sustrato (Anexo 7).

2.1.4.-RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN Y COMPROBACIÓN DEL DNA



(a)

(b)

Figura 8.- Observación de la extracción del DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis (a) tratamiento con agua de pescado (estanque) y (b) tratamiento con agua potable.

La verificación del DNA se realizó en gel de agarosa al 0.8%, en la figura se muestran los tamaños de los fragmentos de las diferentes muestras de extracción de DNA bacteriano.

DISCUSIÓN:

La electroforesis en gel de agarosa es la técnica de separación más utilizada para el análisis y caracterización de ácidos nucleicos de distintas procedencias.

Stryer et al, 2003 encontró que los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño y conformación van a migrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

Para el tratamiento con agua de pescado (estanque) el tamaño de fragmentos oscilo <1000 pb a comparación con el tratamiento de agua potable (muestra 37, 38,43 y 44) su tamaño de fragmento fue de 1000 pb y (muestra 39,40 y 41) son < a 1000 pb, la muestra 45 no dio resultado probablemente sea por la manipulación a la hora de depositar la muestra en el poso del gel.

La adaptabilidad que presentan las especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado físico y multiplicación de estos organismos. Durante el análisis del efecto que tiene el sustrato de heces de ganado bovino con los dos tratamientos de humectación sobre el crecimiento de la lombriz para el estudio del efecto de las heces de ganado bovino sobre los integrones de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* con dos tratamientos de humectación dio como resultado que las bacterias presentes en el tracto digestivo de la lombriz crecen mayor mente a un pH de 9 y se obtiene un mayor rendimiento de numero de colonias ya que a este pH dio como resultado positivo el crecimiento tanto en tubos como en placa, la adición de antibiótico como suplemento al medio de cultivo se hizo con el objetivo de amplificar el número de

copias de DNA plasmídico y por lo tanto un rendimiento final para extracción de DNA. El contenido celular de los cultivos bacterianos obtenidos tras la digestión enzimática del DNA se visualizo por medio de una electroforesis, en un gel de agarosa del 0.8% aquí los fragmentos de DNA viajaron en función de su tamaño en el gel dando resultado diferente para los dos tratamientos de humectación.

2.1.5.- RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DE LONGITUD DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* SUSTRATO "HECES DE GANADO BOVINO" CON TIPO DE HUMECTACION DE "AGUA POTABLE Y AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)"

Análisis estadístico del crecimiento de las lombrices las cuales fueron sometidas con dos tratamientos de humectación y la misma especificidad de sustrato, como se muestra en la figura 9.

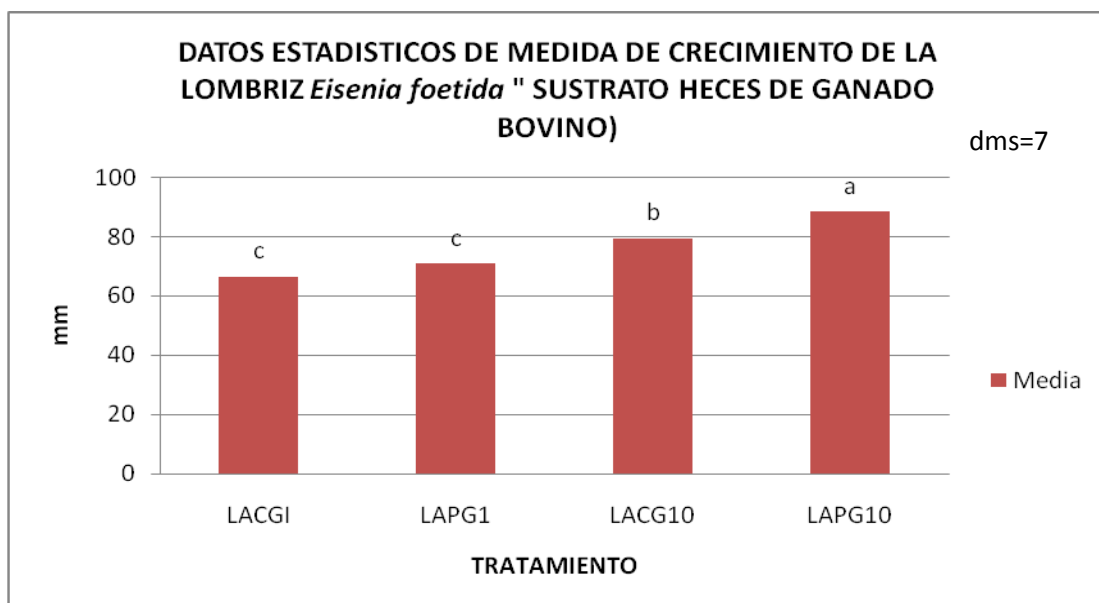


Figura 9.-Se observa el análisis de anova simple para la variable longitud de lombriz, según prueba de tukey < 0.05, con el programa statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.

Las lombrices que fueron alimentadas con heces de ganado bovino durante 155 días humectadas con agua de pescado (estanque) mostraron una diferencia significativa en la variable longitud en las lombrices comparadas con el otro tratamiento, conforme el tiempo las lombrices tienden a crecer en longitud por el consumo de nutrientes contenidos en el sustrato y el tipo de humectación. Sin embargo, el sustrato de heces de ganado bovino humectadas con agua de pescado (estanque) a los 155 días derivó en un 10% mayor longitud que el tratamiento de humectación de agua potable, un 19% mayor longitud para el mismo tratamiento al inicio del experimento y un 24% mayor longitud que el tratamiento con agua potable al inicio del experimento.

2.1.6.- ANALISIS ESTADISTICO DE LAS MEDICIONES DEL DIAMETRO DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* SUSTRATO “HECES DE GANADO BOVINO” CON TIPO DE HUMECTACIÓN DE “AGUA POTABLE Y AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)”

Análisis estadístico del diámetro de las lombrices las cuales fueron sometidas con dos tratamientos de humectación y la misma especificidad de sustrato, como se muestra en la figura 10.

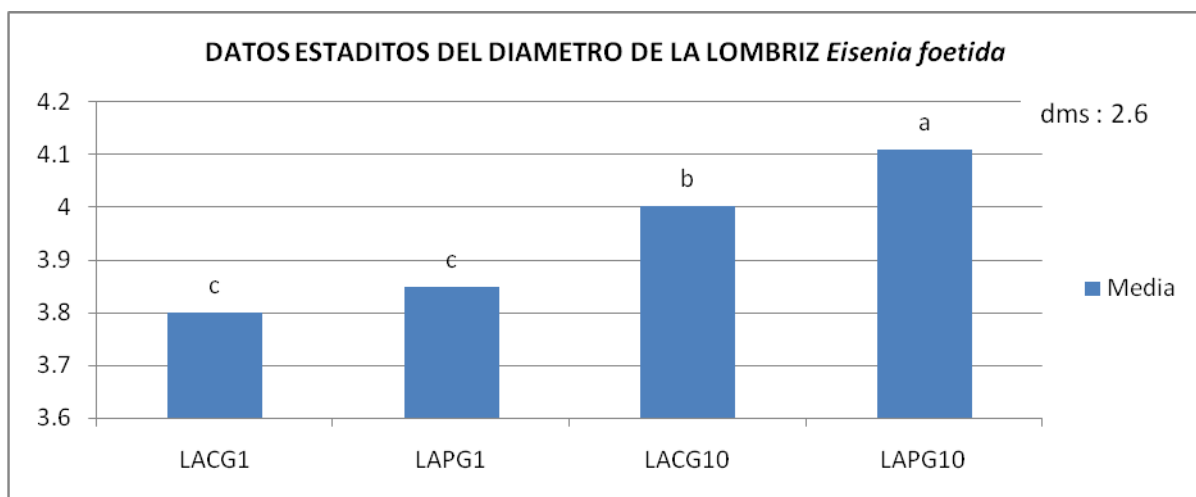


Figura 10.- Se observa el análisis de anova simple para la variable longitud de lombriz, según prueba de tukey < 0.05, con el programa statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.

Las lombrices que fueron alimentadas con heces de ganado bovino durante 155 días y humectadas con agua de pecado (estanque), mostraron una diferencia significativa con respecto al otro tratamiento, conforme el tiempo las lombrices tienden a crecer por el consumo de nutrientes contenidos en el sustrato y el tipo de humectación.

Las lombrices alimentadas a base de sustrato de heces de ganado bovino y humectadas con agua de peces a los 155 días, mostraron un 2.6 a 7.5 % más de diámetro que las lombrices de los otros tratamientos.

Discusión:

La adaptabilidad que presentan las especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado y la multiplicación de este organismo.

Flegel y Schrade, 2000 encontraron que la calidad final del producto “lixiviado” así como la producción de biomasa de la lombriz, dependerá principalmente del sustrato de consumo y de las condiciones de temperatura, humedad y pH.

En relación con los autores se demuestra que el crecimiento de la lombriz *Eisenia foetida* va a depender de las características nutricionales propias del sustrato así como también las características del tipo de humectación (riego) ya que la relación sustrato y los 2 tipos de tratamientos de humectación agua potable y de pescado (estanque) tuvieron un dms de 7 con respecto a la longitud y el dms del diámetro fue de 2.6 respectivamente.

2.2.-CONCLUSIÓN

La adaptabilidad que presentan las especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado físico y la multiplicación de este organismo.

El tratamiento que presenta características favorables para ser utilizado en el crecimiento de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* resultó ser el de humectación con agua de pescado (estanque) siendo el agua potable menos conveniente, tanto el sustrato como el tratamiento de humectación tienen un efecto sobre el DNA de las bacterias.

La electroforesis, brinda una gran ayuda en el campo de la salud, gracias a esta técnica es posible visualizar las bandas de ARN o ADN de patógenos y detectar cambios o mutaciones a nivel genéticos.

2.3.-RECOMENDACIONES

- Dar asesorías técnicas del manejo del equipo de laboratorio para que estos sean utilizados de manera adecuada.
- Durante toda la manipulación del DNA, utilizar guantes plásticos durante todo el proceso, para tomar las muestras, las cuales deben ser puestas en tubos estériles que pueden ser usados para la subsecuente extracción de DNA.
- Para la extracción preparar la solución de lavado antes de cada ensayo, no reutilizar soluciones o restos preparados con anterioridad.
- Al visualizar la imagen en el lector, comprobar que aparezcan los marcadores de posición y que no haya burbujas o manchas que interfieran en la lectura.
- Respetar los tiempos de incubación para que no se produzcan sobre revelados que modifiquen el resultado.

2.5.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta, L., y Brand, H.1992.Materias primas. Lombricultura, la alternativa ecológica para el futuro. pág. 19-39.

Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q., and Metzger, J. D. 2002. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Biores. Technol.* 84: pág.7-14.

Barois, I.1992. Mucus production and microbial activity in the gut of to species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climate.*Soil.Biol.Biochem.*24:1507-1510.

Bergey D., Holt, J., Krieg, N.,and Sneath, P. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, 9^oedition.

Burt R. 2004.*Soil Survey Laboratory Methods Manual*.Soil Survey Investigations Report No. 42. Version 4.0. Natural Resources Conservation Service. United States Department of Agriculture. 700 ps.

Duran L., y Henríquez, C. 2009. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja *Eisenia foetida* en cinco sustratos orgánicos. En: *Agronomía costarricense*, Julio.[http: www.mag.go.cr/rev_agr/v33n02_275.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n02_275.pdf) p. 276.

Flegel M. and Schrade S. 2000.Importance of food quality on selected enzyme activities in earthworm casts (*Dendrobaene octaedra*, Lumbricidae).*Soli Biology & Biochemistry* 32:1191-1196.

Gómez, J. 2000. Los residuos orgánicos. *Abonos orgánicos*. pág. 19.

Ghosh, M., Chattopadhyay, GN. and Baral, K., 1999. Transformation of phosphorus during vermicomposting. *Biores. Technol.* 69: pág.149-154.

Hall RM., and Collis CM.1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* pág.593-600.

Hoffman, CS., and Winston.1987.A ten-minute DNA Preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia Coli*. *Gene* 57: pág. 267-272.

Lattaud,C.,Locati S.,Mora P.,Rouland C. and Lavelle P.1998.The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Applied Soil Ecology* 9: pág.189-195.

Lavelle, P., Lattaud C.,Trigo D.,and Barois I.1995.Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and soil.* 170: pág.23-33.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.Método AS-09.

NMX-FF-109-SCFI-2008.Humus de lombriz (Lombricomposta)-especificaciones y métodos de prueba vermicompost (worm casting)-specifications and test methods. México.

Olivares, CMA., Hernández, A., Vences CJ., y Balderrama, JL. 2012. Lombricomposta y Composta de Estiércol de Ganado Vacuno.pág.14-17.

Parra C. 2008. Caracterización de poblaciones microbianas en dos tipos de Estiércol, durante el proceso de compostaje. Tesis Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Sede Bogotá.

Peralta, M. 1995. Guía N° 2 de Edafología, Universidad de Chile, Fac. de Cs.Forestales. Dpto. de Silvicultura.

Pérez, MO. 2011. Resistencia asociada a integrones de clase 1 en aislados humanos de enterobacter de dos contexto epidemiológico: zoonosis por *salmonella* entérica e infección por *klebsiella* pneumonia adquirida en un centro socio-sanitario; Tesis.pág. 5-30.

Rodicio,MR.,y Mendoza, MC. 2004.Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.

Rodríguez. 2003. Aprovechamiento de residuos orgánicos a través de composteo y lombricomposteo.U.A.A.A.N. Departamento de Fitomejoramiento

Saavedra, M., Benítez, E., Cifuentes, C., and Nogales, R. 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia foetida*. *Biodegradation*. 17: pág. 93.102.

Saiki,RK. y Gelfand, DH. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplication of DNA with a Thermostable DNA Polimerase.pág: 487-491.

Stryer, L., Berg, JM., y Tymoczko, JL.2003: “Bioquímica”, 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España). pág: 152-154.

Zhang, BG., Li G.T., Shen T.S., Wang J.K., and Sun Z. 2000.Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 32:2055-2062.

http://www.somas.org.mx/pdf/pdfs_libros/agriculturasostenible5/5_1/53.pdf

http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/aprov_residuos.pdf.

ANEXO1

Cálculos para la determinación de humedad.

Formula:

$$\%W = \frac{(W_h - M_s) \times 100}{(M_s - M_r)}$$

W_h: Peso de la muestra con suelo

M_s: Peso de la muestra con suelo seco

M_r: Peso del recipiente (caja de aluminio)

$$\frac{15 \text{ gr} - 8.79 \text{ gr}}{8.79 \text{ gr} - 0.43 \text{ gr}} = \frac{6.21}{8.36} = 0.7428 \times 100 = \mathbf{74.28 \%}$$

Cálculo para la determinación de textura de la vermicomposta

Porcentaje de la Arena. Se halló con la primera toma de temperatura

$$\% \text{ Arena} = 100 - (38 + 1.98/50) \times 100$$

$$\% \text{ Arena} = 20.04\%$$

Los porcentajes de arcilla y limo se hallaron con la segunda toma de temperatura:

Que fue de 25°C, de acuerdo a la tabla de corrección de la temperatura utilizamos 1.98.

$$\% \text{ Arcilla} = (16.5 + 1.98/50) \times 100$$

$$\% \text{ Arcilla} = 36.96\%$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - (20.04 + 36.96) = 40\%$$

ANEXO 2

Cuadro de números de réplicas que se hicieron para el aislamiento bacteriano

REPLICA DE TUBOS PARA EL AISLAMIENTO BACTERIANO		
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)		
APG	ID	REPLICA
APG	1	1
APG	2	1
APG	3	1
APG	4	2
APG	5	2
APG	6	2
APG	7	3
APG	8	3
APG	9	3
HECES DE GANADO BOVINO TRATAMIENTO: AGUA POTABLE		
	ID	REPLICA
ACG	37	1
ACG	38	1
ACG	39	1
ACG	40	2
ACG	41	2
ACG	42	2
ACG	43	3
ACG	44	3
ACG	45	3

Cuadro6.-Replica para el aislamiento bacteriano de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* en medio de cultivo LB.

ANEXO 3

CRECIMIENTO BACTERIANO EN EL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO (LB) CON NaCl AL 6%

CRECIMIENTO BACTERIANO (NaCl al 6%) TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO		
	tubos	crecimiento
APG	1a	no
APG	1b	no
APG	2	si
APG	3	no
APG	4	si
APG	5	no
APG	6	no
APG	7	si
APG	8	si
APG	9	si
TRATAMIENTO: AGUA POTABLE		
	TUBOS	crecimiento
ACG	37g	si
ACG	37c	si
ACG	39	no
ACG	40	no
ACG	41	no
ACG	42	si
ACG	43	no
ACG	44	no
ACG	45	no

Cuadro 7.- Datos de crecimiento bacteriano en medio de cultivo (LB) con NaCl al 6% con dos tipos de tratamientos.

ANEXO 4

CRECIMIENTO BACTERIANO EN EL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO (LB) CON NaCl AL 6% CON pH 5

CRECIMIENTO BACTERIANO (NaCl al 6% pH 5)		
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)		
APG	1a	no
APG	1b	no
APG	2	no
APG	3	no
APG	4	si
APG	5	no
APG	6	no
APG	7	no
APG	8	no
APG	9	no
TRATAMIENTO: AGUA POTABLE		
	TUBOS	CRECIMIENTO
ACG	37g	no
ACG	37c	no
ACG	39	no
ACG	40	no
ACG	41	no
ACG	42	si
ACG	43	no
ACG	44	no
ACG	45	no

Cuadro 8.- Crecimiento bacteriano en medio líquido (LB) con una concentración de NaCl al 6% con pH de 5.

ANEXO 5

CULTIVO EN TUBOS CON NaCl al 6% Y EN PLACA pH DE 9

HECES DE GANADO BOVINO			
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)			
	TUBOS	Tubo 20 (ciprofloxacino)	placas
APG	1a	(+)	(+)
APG	1b	(+)	(+)
APG	2	(+)	(+)
APG	3	(+)	(+)
APG	4	(+)	(+)
APG	5	(+)	(+)
APG	6	(+)	(+)
APG	7	(+)	(+)
APG	8	(+)	(+)
APG	9	(+)	(+)
TRATAMIENTO: AGUA POTABLE			
ACG	37c	(+)	(+)
ACG	37g	(+)	(+)
ACG	39	(+)	(+)
ACG	40	(+)	(+)
ACG	41	(+)	(+)
ACG	42	(+)	(+)
ACG	43	(+)	(-)
ACG	44	(+)	(+)
ACG	45	(+)	(+)

Cuadro 9.- Resultados del crecimiento bacteriano suplementado con antibiótico “Ciprofloxacino” en un medio de cultivo LB con un pH de 9 y en cajas Petri a la misma concentración de NaCl.

ANEXO 6

CULTIVO EN TUBOS CON NaCl al 6% Y EN PLACA pH DE 9			
HECES DE GANADO BOVINO			
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)			
	TUBOS	TUBO 24 (TRIMETOPRIMA)	PLACAS
APG	1a	(+)	(+)
APG	1b	(+)	(+)
APG	2	(+)	(+)
APG	3	(+)	(+)
APG	4	(+)	(+)
APG	5	(+)	(+)
APG	6	(+)	(+)
APG	7	(+)	(+)
APG	8	(+)	(+)
APG	9	(+)	(+)
TRATAMIENTO: AGUA POTABLE			
ACG	37c	(+)	(+)
ACG	37g	(+)	(+)
ACG	39	(+)	(+)
ACG	40	(+)	(+)
ACG	41	(+)	(+)
ACG	42	(+)	(+)
ACG	43	(+)	(+)
ACG	44	(+)	(+)
ACG	45	(+)	(+)

Cuadro 10.- Resultados del crecimiento bacteriano suplementado con antibiótico “Trimetoprima” en un medio de cultivo LB con un pH de 9 y en cajas Petri a la misma concentración de NaCl y pH.

ANEXO 7

RESULTADOS DE TINCION DE GRAM

OBSERVACION MICROSCOPICA DE			
BACTERIA OBTENIDAS DE HECES DE LOMBRIZ <i>EISENIA FOETIDA</i> (SUSTRATO " GANADO BOVINO")			
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)			
	Núm. De Tubo	Gram +	Gram -
APG	1a		
APG	1b		
APG	2		
APG	3		
APG	4		
APG	5		
APG	6		
APG	7		
APG	8		
APG	9		
TRATAMIENTO: AGUA POTABLE			
ACG	37g		
ACG	37c		
ACG	39		
ACG	40		
ACG	41		
ACG	42		
ACG	43		
ACG	44		
ACG	45		

Cuadro 11.- Datos diferenciales de la visualización de bacterias

ANEXO 8

TRAT	Media	%	%
LACGI	66.4297	75.1784407	24.8215593
LAPG1	70.6957	80.0062696	19.9937304
LACG10	79.3037	89.7479366	10.2520634
LAPG10	88.3627	100	0

Cuadro 12.-Sustrato de heces de ganado bovino humectadas agua de peces a los 155 días derivó en un 10% mayor longitud que su similar sin agua de peces (estanque), un 19% mayor longitud para el mismo tratamiento al día 0 y un 24.8% mayor longitud que el tratamiento con agua potable a los 0 día.

TRAT	Media	%	%
LACG1	3.8	92.45	7.55
LAPG1	3.85	93.67	6.33
LACG10	4.0033	97.32	2.68
LAPG10	4.11	100	0

Cuadro 13.-Sustrato de heces de ganado bovino y humectas con agua de peces a los 155 días, mostraron un 2.6 a 7.5 % más de diámetro que las lombrices de los otros tratamientos.

ANEXO 9



Figura 11.-Análisis físico-químicos del suelo (humedad, pH, CRA, textura y conductividad eléctrica).

ANEXO 10



Figura 12.- Obtención de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida*.



Figura 13.- Preparación del medio de cultivo LB con NaCl al 6%

ANEXO 11



Figura14.- Antibióticos (tubo 20 es ciprofloxacino y tubo 24 es trimetoprima) utilizados para lograr la amplificación de células portadoras del DNA.



Figura 15.- Crecimiento de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz *Eisenia foetida* en medio de cultivo LB.

ANEXO 12

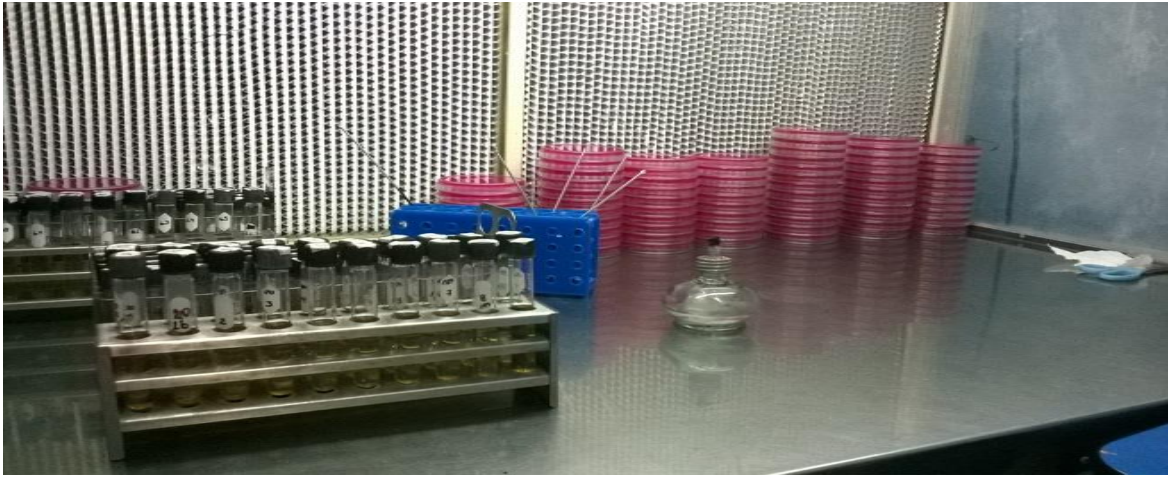


Figura 16.-Preparación para inocular cajas con agar base rojo fenol.



Figura 17.- Cajas inoculas con bacterias aisladas de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* del medio de cultivo.

ANEXO 13

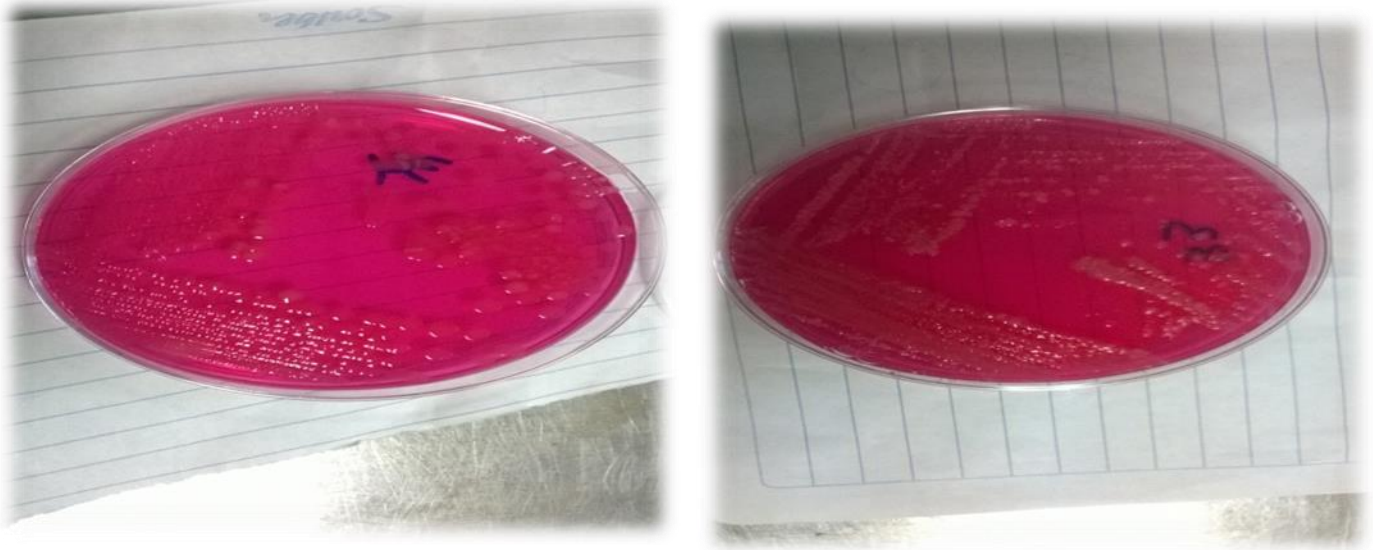


Figura 18.-Características macroscópicas en medio solido de las bacterias aisladas.



Figura 19.- Realización de la tinción de gran para la observación microscópica de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz *Eisenia foetida*.

ANEXO 14

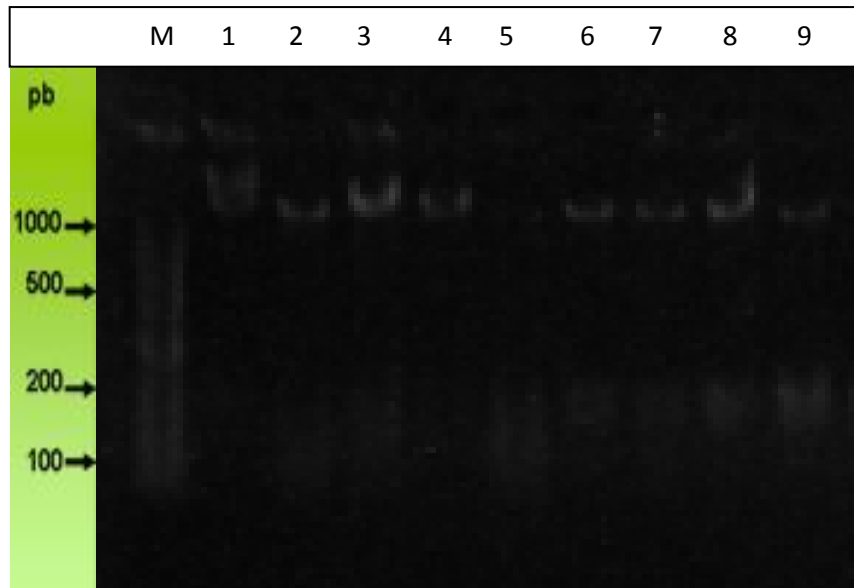


Figura 20.- Muestras de las bacteria aisladas de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* para la extracción y amplificación del DNA.

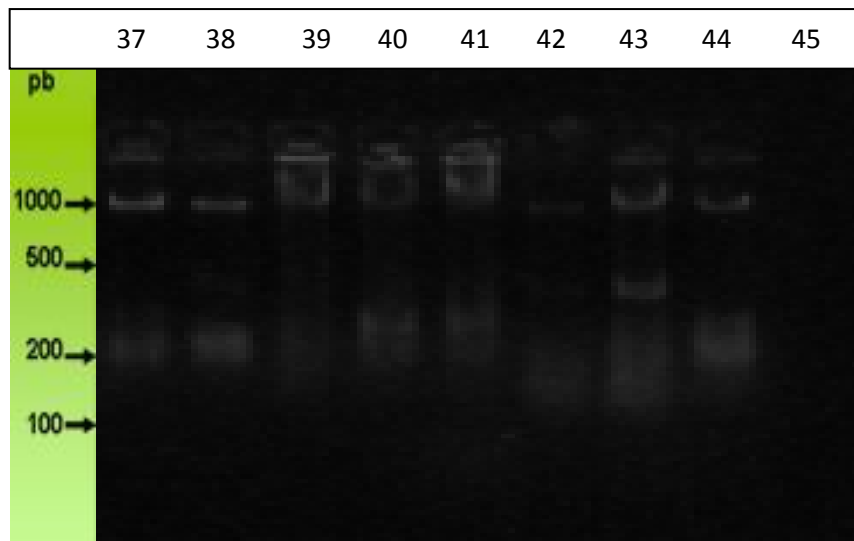


Figura 21.-Extracción del DNA de las bacterias aisladas de las heces de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida*.

ANEXO 15



(a)



(b)

Figura 22.-Observación de la extracción del DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis (a) es tratamiento con agua de pescado (estanque) y (b) tratamiento con agua potable.