



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
TUXTLA GUTIERREZ**

RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERIA BIOQUIMICA

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA IDENTIFICAR
INTEGRONES DE CLASE I”**

PRESENTA: Dr. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS AGOSTO-DICIEMBRE DEL 2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	6
2. JUSTIFICACION	7
3. OBJETIVOS	7
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	7
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPO.	8
5. PROBLEMAS A RESOLVER.....	9
6. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	9
7. FUNDAMENTOS TEORICO	10
7.1. CARACTERISTICA DE LAS LOMBRICES	10
7.1.2. LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (Eisenia Foetida).....	11
7.1.3. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (Eisenia Foetida)	13
7.1.4. EXPLOTACIÓN DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA.....	15
7.1.5. EL SUSTRATO.....	16
7.1.6. CONTROL DE LA ACIDEZ	17
7.2 CARACTERISTICAS DEL ESTIERCOL DE CONEJO	19
7.3 INCORPORACIÓN DE LAS LOMBRICES AL SUSTRATO	19
7.3.1. EL HUMUS DE LA LOMBRIZ.....	20
7.3.2 PRINCIPALES PROPIEDADES DEL HUMUS DE LOMBRIZ.....	22
7.3.3. PRINCIPALES ENEMIGOS DE LA LOMBRIZ	24
7.4. EXPLOTACIÓN ECOLOGICA.....	25
7.5. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ADN.....	26
7.5.1 REPLICACIÓN DEL ADN.	27
7.6 ESTRUCTURA DE LOS INTEGRONES	28
7.6.1 INTEGRONES DE CLASE I.....	28
7.6.2 LA PLATAFORMA DEL FUNCIONAMIENTO	29
7.6.3 DIFERENTES TIPOS DE INTEGRONES	31

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	34
9. RESULTADOS.....	42
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
12. CONCLUSIÓN.....	50
11. BIBLIOGRAFIA.....	51
12. ANEXOS.....	54

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Serie de tubos por sustrato	55
Cuadro 2. Crecimiento bacteriano en NaCl al 6% con pH 5.	56
Cuadro 3. Antibióticos trimetoprima y ciprofloxacino en cultivos de tubos y placas con pH 9.	57
Cuadro. 4. Análisis macroscópicos de las bacterias aisladas	59
Cuadro. 5 Mediciones de longitud de la lombriz <i>eisenia foetida</i> utilizando como sustrato heces de conejo con dos tratamientos agua corriente y agua de pescado.	60
Cuadro. 6 Mediciones de diámetro de la lombriz <i>eisenia foetida</i> utilizando como sustrato heces de conejo con dos tratamientos agua corriente y agua de pescado.	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Lombriz roja californiana adulta.	12
Figura 2. Componentes del humus de lombriz.	15
Figura 3. Modelo de estructura de DNA.	26
Figura 4. Modelo de replicación de DNA.	27
Figura 5. Estructura típica de un integron de clase I.	29
Figura 6. Integración de genes en cassette de un integron.	31
Figura 7. Preparación de diluciones para sembrar en cajas petri.	36
Figura 8. Estría cruzada de medios	37
Figura 9. Resultados de la extracción de DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis	45
Figura 10. Diferentes muestras de extracción de DNA bacteriano utilizando gel de agarosa al 0.8%	45
Figura 11. Análisis de ANOVA simple para la variable Longitud de lombriz, según prueba de Tukey <0.05, con el programa Statgraphic.	47
Figura 12. Análisis de ANOVA simple para la variable Diámetro de lombriz, según prueba Tukey <0.05, con el programa Statgraphic.	48

1. INTRODUCCION

Un integrón es un elemento genético dinámico, que funciona como un sistema de captura de genes y provee un mecanismo para la adquisición y diseminación de genes de resistencia, el cual puede localizarse en plásmidos, transposones e incluso en el cromosoma bacteriano. En base a la secuencia del gen de la integrasa presente en los integrones, se han reportado más de nueve clases, siendo los integrones clase 1 los que con mayor frecuencia se han asociado a bacterias Gram negativas (Collis C. 1995). El objetivo de este proyecto es estandarizar la técnica para identificar integrones de clase I de las heces de lombriz roja californiana (*Eisenia Foetida*) teniendo uso como sustrato de las heces de conejo.

Aunque las muestras de heces se caracterizan por la poca cantidad y pobre calidad de ADN que contienen y pueden ser extraídos (Panasci 2011), es necesario la adecuación de los protocolos de extracción para cada especie, a fin de que permita obtener ADN de suficiente calidad para la realización de estudios genéticos (Taberlet 1996), inclusive a nivel genómico (Ouborg 2010). Estudios en heces de rumiantes como la cabra de montaña *Oreamnos americanus* (Poole 2011), el cérvido Sitka de cola negra *Odocoileus bemionus sitkensis* (Brinkman 2011) y la oveja de las Montañas *Ovis canadensis* (Wehausen 2004), han demostrado muy buena recuperación de ADN para realizar un buen estudio en cuanto a esto.

El emplear la lombriz roja californiana (*Eisenia Foetida*) como instrumento para obtener las heces fue debido a que tienen un sistema muscular muy desarrollado escavando así galerías en la tierra y mientras realiza esta operación devora grandes cantidades de tierra, hojas descompuestas y, en general, cualquier residuo orgánico, que son transformados en su intestino y expulsados por el ano en forma de humus lombriz. No se come las raíces de las plantas mientras aquellas permaneces vivas, por lo que no perjudica a los cultivos.

La lombriz roja, como cualquier otro animal explotado por el hombre, tiene sus exigencias de hábitat. No contrae enfermedades, pero se puede envenenar por una dosis excesiva de proteínas, lo que ocurre cuando las proteínas de los estiércoles no están fermentadas suficientemente, dando origen a una acidificación del medio y a un desprendimiento de gases nocivos, ambos letales para la lombriz. Carlos Ferruzzi 1987

2. JUSTIFICACION

Este trabajo se realiza con el fin de extraer ADN estandarizando la técnica para poder identificar adecuadamente los integrones de clase I obtenido de heces de conejo, para que en trabajos posteriores poder proponer otros estudios que nos indiquen la utilización de estas heces como abonos naturales, regeneradores de suelos.

3. OBJETIVOS

Estandarizar la técnica para identificar Integrones de clase I.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento de cepas en un medio selectivo para aeromonas.
- Extracción de ADN de las cepas de aeromonas.
- Separar mediante electroforesis en gel de agarosa moléculas de ADN obtenida de muestras (heces de conejo).

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPO.

MISIÓN:

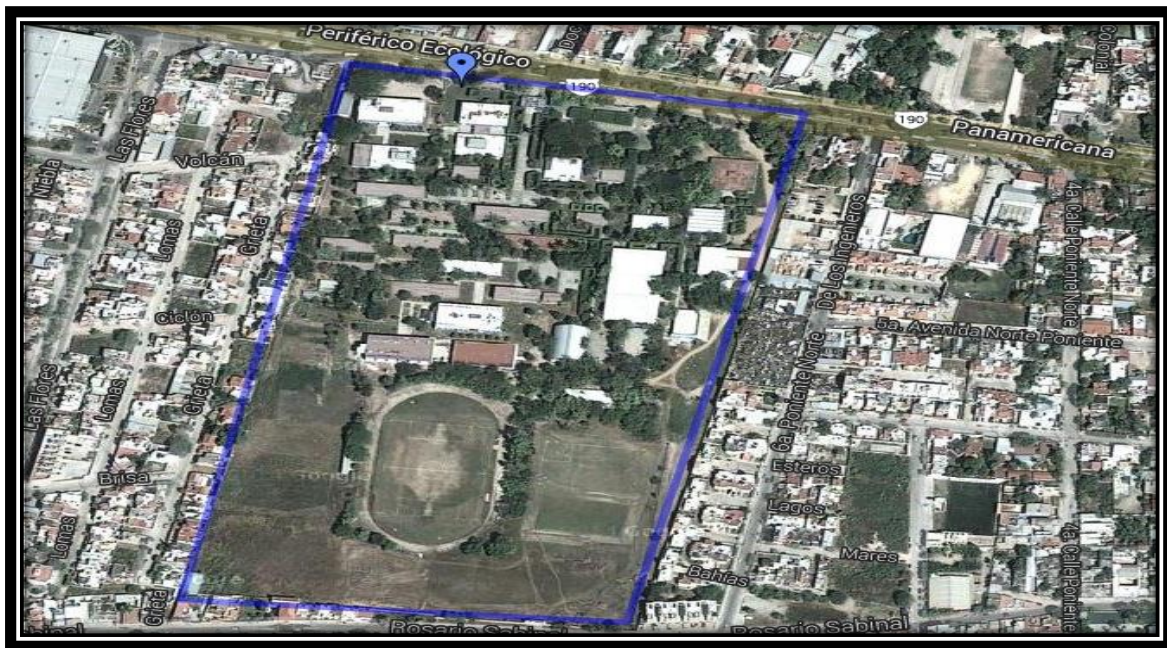
Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

VISIÓN:

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico de la región.

VALORES:

El ser humano, espíritu de servicio, liderazgo, trabajo en equipo, calidad, alto desempeño, respeto al medio ambiente.



5. PROBLEMAS A RESOLVER

- Mediante la extracción de ADN estudiar algunos suelos convenientes para la siembra de algún tipo de cultivo y este apto para poder producir de la manera adecuada teniendo todo el nutriente dicho suelo para sacar el mayor porcentaje de siembra requerida.
- Mantener a las lombrices rojas californianas en un lugar adecuado para su desarrollo y crecimiento sin descuidar su condición de vida y sobrevivencia para poder utilizar el humus como composta en cultivos.
- Aprovechar desechos orgánicos como el estiércol de conejo y bagazo de caña para hacer el sustrato, de los cuales podremos obtener abonos y lixiviados a partir de un desecho industrial como lo es el bagazo de caña y el estiércol.
- Generar una alternativa para poder regenerar suelos erosionados por diversas causas.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Uno de los alcances será que si tenemos el suficiente reactivo y materia prima encontraremos, un uso al bagazo de caña que por ahora puede estar causando contaminación por su alta producción y acumulación.

Las limitaciones a este estudio serán si no contamos con los fondos para adquisición de los reactivos, que las lombrices intoxiquen sustancias de las heces de conejo y que no se tenga la materia prima para el estudio.

7. FUNDAMENTOS TEORICO

7.1. CARACTERISTICA DE LAS LOMBRICES

La lombriz de tierra pertenece al grupo de los invertebrados anélidos, que tienen el cuerpo formado por numerosos anillos. Tiene un sistema muscular muy desarrollado, por medio del cual puede ejecutar movimientos en todos los sentidos. No posee ojos, pero sí unas células especiales distribuidas a lo largo de su cuerpo que son muy sensibles a la luz. Esto le permite retirarse con rapidez cuando se expone a la luz solar, ya que los rayos ultravioleta la matan en pocos minutos. Le perjudica tanto la falta como el exceso de humedad. En el agua se asfixia y, por ello, huye cuando sus galerías se inundan por la Lluvia, mientras que cuando falta la humedad queda inactiva y se muere en poco tiempo. Carlos Ferruzzi 1987

La lombriz escava galerías en la tierra y mientras realiza esta operación devora grandes cantidades de tierra, hojas descompuestas y, en general, cualquier residuo orgánico, que son transformados en su intestino y expulsados por el ano en forma de «humus de lombriz». No se come las raíces de las plantas mientras aquéllas permanecen vivas, por lo que no perjudica a los cultivos.

Tanto la acción mecánica de excavación, que airea la tierra y facilita la penetración del agua de lluvia, como la acción química del humus que expulsa contribuyen a enriquecer la fertilidad del suelo. Algunos autores dicen que la fertilidad del valle del Nilo se debe, fundamentalmente, a la actividad de las lombrices, que ha permitido cultivar esas tierras durante miles de años sin que disminuya su fertilidad. Carlos Ferruzzi 1987.

Cada individuo está dotado de órganos sexuales masculinos y femeninos, situados en la parte anterior del cuerpo, pero es incapaz de fecundarse a sí mismo. La fecundación es recíproca entre dos individuos que se aparean, de tal

forma que cada uno de ellos recibe el esperma del otro y lo retiene en su aparato genital femenino hasta el momento de la fecundación. Carlos Ferruzzi 1987.

En la parte anterior del cuerpo, a la altura del primer tercio, la lombriz adulta tiene un anillo especial, el clitelium, de mayor grosor que el resto del cuerpo, por donde segrega un líquido viscoso que forma una especie de cápsula de color amarillo verdoso y de 2 a 3 milímetros de diámetro, cuya misión es proteger a los huevos. Pasados de 14 a 21 días de incubación, las crías rompen la cápsula y salen al exterior. Carlos Ferruzzi 1987.

Existen numerosas especies de lombrices, aunque desde el punto de vista que nos interesa conviene dividirlos en dos grupos: Lombrices silvestres y domésticas. Carlos Ferruzzi 1987.

7.1.2. LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (*Eisenia Foetida*)

Entre las pocas especies de lombrices que pueden explotarse en cautividad está la lombriz roja de California, de la cual se han obtenido, por selección, varios tipos, que se pueden explotar en terrenos al aire libre de cualquier zona de clima mediterráneo sin necesidad de ningún tipo de alojamiento fijo. La selección de esta lombriz estuvo orientada inicialmente a aumentar la cantidad de comida ingerida, con el fin de incrementar la producción de humus, pero no se obtuvieron resultados positivos, por lo que la selección se encaminó a prolongar su vida y aumentar la frecuencia de la reproducción. Carlos Ferruzzi. 1987.

La lombriz roja, cuando es adulta, mide de 5 a 6 centímetros, su diámetro oscila entre 3 y 5 milímetros, es de color rojo oscuro y pesa aproximadamente un gramo. Cuando las condiciones del medio son favorables, esta lombriz ingiere diariamente una cantidad de comida equivalente a su propio peso, del cual expele un 60 por 100 en forma de humus. Carlos Ferruzzi 1987.

La lombriz roja puede vivir hasta 16 años. Cuando la temperatura y la humedad del medio donde vive son adecuadas, se aparea cada 7 días. Las cápsulas se abren pasados entre 14 y 21. Carlos Ferruzzi 1987.



Fig. 1 Lombriz roja californiana adulta

Días de incubación, según sea la temperatura del medio, y de cada una de ellas sale un número de crías que oscila entre 2 y 20. Las lombrices recién nacidas son de color blanco, que se vuelve rosado a los 5 ó 6 días y se convierte definitivamente en rojo oscuro a los 15 o 20 días. El tamaño de individuo adulto se alcanza a la edad de 7 meses, Carlos Ferruzzi 1987.

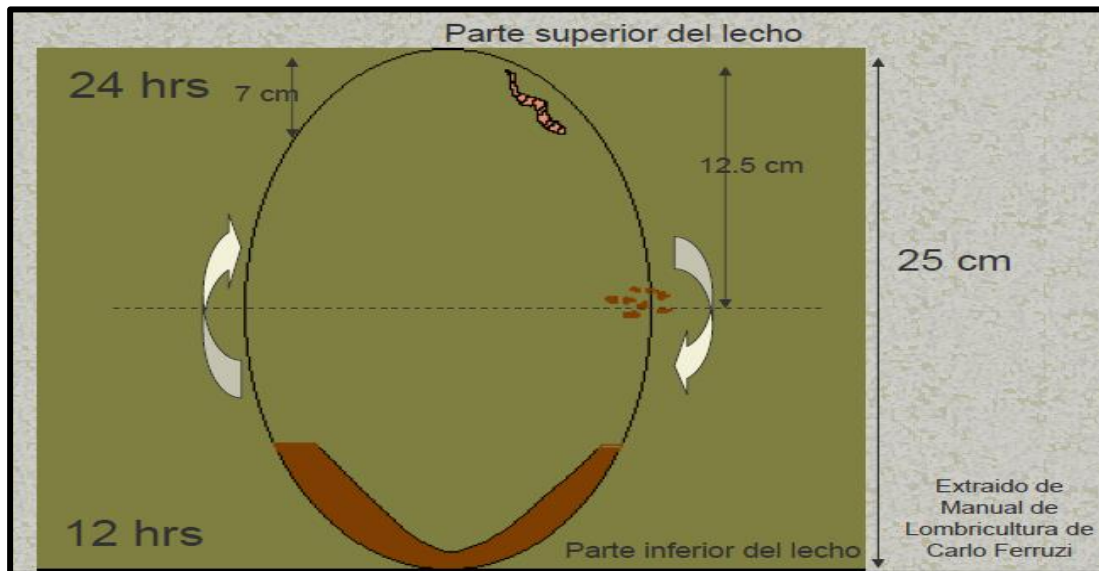
La actividad sexual disminuye en los meses fríos y en los calurosos, siendo mayor durante los meses templados. La máxima actividad sexual se logra cuando la temperatura del medio donde habita oscila alrededor de los 20 grados centígrados.

A diferencia de la lombriz común, que tiende a alejarse del lugar donde inicialmente se ha instalado, la lombriz roja no se aleja de sus alojamientos, salvo en el caso de que surjan unas condiciones muy desfavorables. La lombriz roja no deposita sus deyecciones sobre la superficie del suelo, con lo cual no existe la posibilidad de que una parte de éstas sea arrastrada por el viento o por el agua.

En términos generales, al cabo de un año, un módulo inicial de lombriz roja se multiplica de 8 a 12 veces, Carlos Ferruzzi 1987.

7.1.3. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA (*Eisenia Foetida*)

- Longevidad: Aprox. 16 años en condiciones de crianza
- Prolificidad: hasta 1500 crías anual por individuo
- Deyecciones: MO estabilizada humus con una riqueza en flora bacteriana de 2 billones de colonias vivas por gramo de humus producido.
- Habito diario (representado esquemáticamente).



Prolificidad:

- Edad sexual: 90 días
- Acoplamientos: cada 7 días
- Eclosión de capsulas a los 12 a 21 días
- Cada capsula contiene 2 a 21 pequeñas lombrices.

Condiciones ambientales:

- T° optima, para el crecimiento: 12 y 25°C
- T° óptima para formación de cocones: 12 a 15°C
- T° Max. tolerable: 42 °C
- T° Min. para la reproducción: 7°C

- T° Min tolerable: 0°C
- pH optimo: 6.8 a 7.2
- pH tolerable: 3.5 a 8.7
- Humedad Relativa optima: 82.5% de la Ha (según USA, en condiciones de campo se estima que es cuando esté friable).

Alimentación: El alimento que se les proporcionará será materia orgánica parcial o totalmente descompuesta. Si no es así las elevadas temperaturas generadas durante el proceso de fermentación (hasta 75° C), matarán a las lombrices, esto siempre que se presenten condiciones Anaeróbicas.

Tipos de alimentos: Los alimentos orgánicos útiles en la alimentación de lombrices son muy variados, destacando entre otros:

- Restos de serrerías e industrias relacionadas con la madera
- Desperdicios de mataderos.
- Residuos vegetales procedentes de explotaciones agrícolas, como bagazo de caña de azúcar, pajas, rastrojos, alfalfa, cáscaras de semillas, etc.
- Frutas y tubérculos no aptos para el consumo humano o vegetal.
- Fangos de depuradoras.
- Basuras.
- Estiércoles de animales (vacunos, equinos, caprinos, porcinos, ovinos, conejos, aves, etc.)
- Papel, cartón, harinas, etc.
- Residuos orgánicos domiciliarios biodegradables (corte de pastos o gramíneas, etc.).

Composición del Humus de Lombriz

Humedad	30-60%
pH	6.8-7.2
Nitrógeno	1-2.6%
Fosforo	2-8%
Potasio	1-2.5%
Calcio	2-8%
Magnesio	1-2.5%
Materia orgánica	30-70%
Carbono orgánico	14-30%
Ácidos fúlvicos	14-30%
Ácidos húmicos	2.8-5.8%
Sodio	0.02%
Cobre	0.05%
Hierro	0.02%
Magnesio	0.006%
Relación C/N	10-11

Fig. 2 Componentes del humus de lombriz

7.1.4. EXPLOTACIÓN DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA

La lombriz roja se puede explotar bajo dos modalidades:

- **Explotación productiva:** Tiene por finalidad el aprovechamiento de los productos de la lombriz: humus y carne. El humus procedente de estas explotaciones es de excelente calidad, dependiendo en todo caso del tipo de

materia orgánica que se suministre como alimento, que generalmente consiste en estiércol de diferentes especies ganaderas. Aparte de su riqueza en principios nutritivos, este humus contiene una flora bacteriana riquísima (hasta medio billón de colonias de bacterias activas por gramo de humus), lo que da lugar a una gran variedad de enzimas que actúan como elemento corrector de los suelos. Carlos Ferruzzi 1987.

En la explotación productiva de la lombriz roja se denomina lecho, bandeja o habitáculo a la unidad modular compuesta por una superficie rectangular de dimensiones 2 x 1= 2 metros cuadrados. Cada una de estas unidades contiene unas 100.000 lombrices de distintos tamaños, incluyendo las cápsulas. Carlos Ferruzzi 1987.

La lombriz roja, como cualquier otro animal explotado por el hombre, tiene sus exigencias de hábitat. No contrae enfermedades, pero se puede envenenar por una dosis excesiva de proteínas, lo que ocurre cuando las proteínas de los estiércoles no están fermentadas suficientemente, dando origen a una acidificación del medio y a un desprendimiento de gases nocivos, ambos letales para la lombriz, Carlos Ferruzzi 1987.

- **Explotación ecológica:** Es aquella que tiene por finalidad la transformación de sustancias orgánicas residuales o molestas: residuos industriales, basuras de población, etc. El humus obtenido en estas explotaciones es de baja calidad, ya que contiene una flora bacteriana muy pobre y, además, puede contener una considerable proporción de metales pesados tóxicos. No es aconsejable utilizar este humus para cultivos destinados a la alimentación, pero sí que se puede utilizar en floricultura, cultivos industriales, etc., cuyos productos no se ingieren.

7.1.5. EL SUSTRATO

Recibe el nombre de sustrato la primera capa del lecho, sobre la cual se incorporan las lombrices. El sustrato, que constituye la base del lecho, se forma con sustancias orgánicas, siendo lo más conveniente que tenga una cantidad de

celulosa entre el 20 y el 25 por 100. El espesor del sustrato será de unos 15 centímetros en verano y 25 centímetros en invierno.

Normalmente, tanto el sustrato como la materia orgánica que sirve de alimento a las lombrices están constituidos por estiércol. Habrá que tener la precaución de utilizar un estiércol descompuesto, cuya temperatura no exceda de los 25 grados centígrados. Cuando el estiércol está en fase de fermentación, su temperatura puede alcanzar los 70 u 80 grados centígrados, o incluso más. Estas temperaturas tan elevadas, así como el grado de acidez y los gases que se desprenden durante la fermentación, provocan la muerte de las lombrices. Carlos Ferruzzi 1987.

El sustrato se puede colocar directamente sobre el terreno cuando éste es suficientemente impermeable, aunque, en cualquier caso, siempre es preferible colocarlo sobre una lámina de material plástico que evite su contacto directo con aquél, lo que, además, facilita la recogida del humus. Cuando los estiércoles son ricos en proteínas conviene extender papel o cartón sobre la base de los lechos, con el fin de aumentar el aporte de celulosa del sustrato. Carlos Ferruzzi 1987.

7.1.6. CONTROL DE LA ACIDEZ

Antes de incorporar estiércol a los lechos (tanto en forma de sustrato como en forma de alimento) es necesario comprobar su acidez. No conviene fiarse demasiado del estado de envejecimiento del estiércol suministrado por los ganaderos, ya que muchos tienen por costumbre almacenarlo en montones por capas sucesivas, de tal forma que sobre el estiércol más antiguo se van colocando otras capas de estiércol fresco, cuyos purines escurren a través del montón.

El grado de acidez o de alcalinidad se expresa mediante la anotación pH, que varía desde 0 a 14. Las sustancias cuyo pH está comprendido entre 0 y 7 son ácidas, y aquellas otras cuyo pH está comprendido entre 7 y 14 son básicas.

El pH = 7 indica que la sustancia es neutra.

El alimento de las lombrices deberá tener un pH comprendido entre 6,5 y 7,5; los valores óptimos se encuentran entre 6,8 y 7,2.

Existen dos métodos usuales para medir el pH de una sustancia: el papel tornasol y el potenciómetro. Carlos Ferruzzi. 1987.

- Para medir el pH con papel tornasol se introduce un trozo de este papel entre un puñado de estiércol humedecido que se mantiene dentro de la mano cerrada durante veinte a treinta segundos. Después de abrir la mano se esperan unos veinte a treinta segundos, al cabo de los cuales se comprobará que el papel tornasol ha cambiado de color. A continuación se compara el color que ha tomado el papel del ensayo con una muestra de colores para apreciar el pH correspondiente por equiparación de colores entre el tomado por el papel tornasol y el de la escala, Carlos Ferruzzi 1987.

- El potenciómetro es un aparato que mide directamente el pH de una sustancia con relación a la temperatura de esa sustancia. Existen en el mercado varios modelos de peachimetros, cuya forma de operar viene indicada en las normas que acompañan a cada uno de ellos.

La prueba del pH, tanto si se hace con papel tornasol como si se hace con potenciómetro, debe repetirse en varios puntos del montón de estiércol.

Aparte de las pruebas de acidez, antes de incorporar las lombrices al sustrato o de suministrar nuevo alimento hay que hacer la prueba de supervivencia de las lombrices. Esta prueba se realiza en una caja de madera, de dimensiones aproximadas de 30 x 30 x 20 centímetros, en donde se echa una capa de estiércol de cinco a diez centímetros de espesor. En las caras laterales de la caja, junto a la base de la misma, se perforan unos agujeros de un centímetro de diámetro.

El estiércol de la caja se riega de modo que quede bien humedecido, aunque no encharcado, y a continuación se colocan sobre él 20 lombrices adultas. Conviene que las lombrices se introduzcan solas en el estiércol, sin recubrirlas con él. Esta operación se realiza a la luz del día, lo que induce a las lombrices a introducirse con rapidez. Sabremos que el estiércol es adecuado cuando al cabo de veinticuatro horas todas las lombrices permanecen en buen estado. Si alguna

lombriz se ha escapado por los agujeros de drenaje o se ha muerto, es señal de que el estiércol no reúne las condiciones adecuadas, por lo que habrá que esperar más tiempo para la correcta fermentación o maduración del mismo. Cuando no se dispone de tiempo suficiente para la maduración del estiércol, se puede reducir su acidez mediante la incorporación de carbonato cálcico. Carlos Ferruzzi 1987.

7.2 CARACTERÍSTICAS DEL ESTIERCOL DE CONEJO

Por lo general, no es aconsejable el estiércol procedente de explotaciones intensivas de aves, debido a su elevada acidez, lo cual exige para su neutralización un largo período de tiempo de maduración (catorce a dieciocho meses). Tampoco es aconsejable el estiércol procedente de cualquier especie animal cuyo período de maduración o fermentación sea superior a dos años, ya que su contenido en proteínas y vitaminas es muy reducido.

No conviene mezclar estiércoles de distintas procedencias, aunque sean de la misma especie animal, pues es casi seguro que tengan distinta composición o que estén en diferente fase de maduración.

La lombriz ingiere más alimento cuanto más fino sea el tamaño de los gránulos de comida. Por tanto, la producción será mayor cuanto más desmenuzado se encuentre el estiércol. Carlos Ferruzzi 1987.

✓ **Estiércol de conejo:** Este estiércol es de buena calidad. El estiércol recogido debajo de las jaulas, en donde se mezclan las deyecciones sólidas y líquidas, necesita algún tiempo de maduración. Si por cualquier procedimiento se separan los sólidos de los líquidos, la parte sólida puede utilizarse directamente sin previa maduración, Carlos Ferruzzi 1987.

7.3 INCORPORACIÓN DE LAS LOMBRICES AL SUSTRATO

La incorporación de lombrices al sustrato (inseminación) se realiza después de efectuada la prueba de supervivencia de las lombrices en ese sustrato. Las

lombrices vienen preparadas en las cajas de expedición en donde se encuentran lombrices de todos los tamaños (incluyendo las cápsulas de los huevos) mezcladas con el alimento.

La mezcla de lombrices y alimento contenidos en las cajas de expedición se vacían sobre el sustrato. Con un rastrillo de puntas redondeadas se procura que aquella mezcla quede enterrada en el sustrato, dejando la superficie del mismo liso y uniforme. Se riega con agua procurando que el lecho quede humedecido, pero no encharcado, Carlos Ferruzzi 1987.

La incorporación de las lombrices se hace a la luz del día, preferentemente durante las primeras horas de la mañana, con el fin de incitar a las lombrices a introducirse con más rapidez en el sustrato.

Durante la primera semana se controla diariamente el lecho, para comprobar si surge alguna anomalía. El lecho se mantiene siempre húmedo, mediante los riegos que se consideren necesarios. No hace falta incorporar nuevo alimento hasta pasados unos treinta días de la inseminación, Carlos Ferruzzi 1987.

La mejor época para hacer la inseminación es la comprendida entre los meses de marzo y octubre, ya que durante este tiempo no existen diferencias apreciables de temperatura entre el estiércol que ha de servir de sustrato y el estiércol contenido en las cajas de expedición. Cuando la inseminación se hace durante los meses fríos habrá que tomar las precauciones pertinentes para evitar esas diferencias de temperatura. Carlos Ferruzzi 1987.

7.3.1. EL HUMUS DE LA LOMBRIZ

El humus de lombriz es un abono muy eficaz, pues, además de poseer todos los elementos nutritivos esenciales, contiene una flora bacteriana riquísima, que permite la recuperación de sustancias nutritivas retenidas en el terreno, la transformación de otras materias orgánicas y la eliminación de muchos elementos

contaminantes. El alto contenido de ácidos húmicos aporta una amplia gama de sustancias fitorreguladoras del crecimiento de las plantas.

La calidad del humus depende, además de la alimentación empleada, de su granulometría. El más fino se absorbe muy rápidamente y se destina a las plantas que tienen necesidades urgentes; el de granulometría media se utiliza en floricultura y en horticultura; el de grano más grueso se utiliza en frutales y en otras plantas que lo han de absorber en un plazo más largo. Carlos Ferruzzi 1987.

El humus de lombriz es neutro, por lo cual crea un medio desfavorable para la proliferación de ciertos parásitos. De ahí su interés por emplearlo en cultivos que se encuentren parasitados. Es inodoro y, aunque se dosifique en exceso, no quema a las plantas más jóvenes y delicadas. Al ser un producto estable puede permanecer almacenado mucho tiempo sin sufrir alteraciones. Cuando se envasa en sacos de plástico se han de practicar unos agujeros en el envase, con el fin de que pueda sobrevivir la flora bacteriana. Carlos Ferruzzi. 1987.

Debido a su precio elevado, el humus de lombriz se emplea preferentemente en cultivos intensivos, pero también puede emplearse en cultivos extensivos. La cantidad a incorporar en uno u otro caso dependerá, en todo caso, de los análisis químicos de la tierra y del humus. La incorporación de humus a la tierra destinada a cultivos extensivos se hace durante la primavera y el otoño.

En algunas experiencias realizadas en terrenos que habían quedado casi estériles (por la explotación abusiva durante mucho tiempo o por el exceso de fertilizantes químicos) se ha demostrado que la incorporación de humus de lombriz hace proliferar extraordinariamente la flora bacteriana inicial, con lo cual dichos terrenos recuperan su fertilidad.

Aunque existe poca experiencia al respecto, se podría pensar en recuperar terrenos casi estériles incorporando directamente las lombrices a ese terreno. Después de dar una labor se extiende sobre la superficie el alimento (estiércol madurado); se riega para mantener el estiércol humedecido, y, a continuación, se

hace la inseminación de lombrices a razón de unas cincuenta lombrices por metro cuadrado. La inseminación se hace en primavera o en otoño y a la luz del día, para estimular a las lombrices a introducirse en la tierra. Carlos Ferruzzi 1987.

Las necesidades alimenticias de las lombrices se cubren con 50 a 60 toneladas de estiércol, que se incorporan en dos veces: inmediatamente antes de la inseminación y transcurridos seis meses de ésta. Es necesario dejar el terreno sin cultivar hasta pasado un año después de la inseminación. Carlos Ferruzzi 1987.

7.3.2 PRINCIPALES PROPIEDADES DEL HUMUS DE LOMBRIZ

El humus de lombriz es considerado uno de los mejores fertilizantes orgánico, al ser el resultado de la digestión de múltiples microorganismos y como punto final el paso por el tubo digestivo de la lombriz, el cual le aporta propiedades antibióticas, potenciadores radiculares y otras que se enumeran a continuación:

- Es un material de color oscuro, con un agradable olor a mantillo del bosque.
- Es limpio, suave al tacto y su gran bio-estabilidad evita su fermentación o putrefacción.
- Contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que aumenta la solubilización de los nutrientes haciendo que puedan ser inmediatamente asimilables por las raíces. Por otra parte, impide que éstos sean lavados por el agua de riego, manteniéndolos por más tiempo en el suelo.
- Influye de forma efectiva en la germinación de las semillas y en el desarrollo de los planteles.
- Aumenta notablemente el porte de plantas, árboles y arbustos en comparación con otros ejemplares de la misma edad.
- Durante el trasplante previene enfermedades y evita el shock por heridas cambios bruscos de temperatura y humedad.
- Se puede usar sin inconvenientes en estado puro y se encuentra libre de nemátodos.
- Favorece la formación de micorrizas.

- Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas a las plagas y agentes patógenos.
- Su pH neutro lo hace sumamente adecuado para ser usado con plantas delicadas.
- Aporta y contribuye al mantenimiento y al desarrollo de la micro flora y micro fauna del suelo.
- Favorece la absorción radicular.
- Regula el incremento y la actividad de los microorganismos nitrificadores del suelo.
- Facilita la absorción de los elementos nutritivos por parte de la planta. La acción microbiana del humus de lombriz hace asimilable para las plantas minerales como el fósforo, calcio, potasio, magnesio y oligoelementos.
- Transmite directamente del terreno a la planta hormonas, vitaminas, proteínas y otras fracciones humificadoras.
- Aporta nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, boro, y los libera gradualmente, e interviene en la fertilidad física del suelo porque aumenta la superficie activa.
- Absorbe los compuestos de reducción que se han formado en el terreno por compresión natural o artificial.
- Mejora las características estructurales del terreno, desligando los arcillosos y agregando los arenosos.
- Neutraliza eventuales presencias contaminadoras, (herbicidas, ésteres fosfóricos).
- Evita y combate la clorosis férrica.
- Facilita y aumenta la eficacia del trabajo mecánico del terreno.
- Por los altos contenidos de ácidos húmicos y fúlvicos, mejora las características químicas del suelo.
- Mejora la calidad y las propiedades biológicas de los productos del campo..
- Aumenta la resistencia a las heladas.

- Aumenta la retención hídrica de los suelos (4-27%) disminuyendo el consumo de agua en los cultivos. Por este motivo, además de sus propiedades como fertilizante, se está empleando en canchas de golf para disminuir el alto consumo de agua que tienen estas instalaciones.

7.3.3. PRINCIPALES ENEMIGOS DE LA LOMBRIZ

El topo es, quizá, el peor enemigo de la lombriz. Cuando un topo accede a un lecho puede acabar con toda la población de lombrices en unos pocos días, por cuyo motivo hay que evitar, a toda costa, la presencia de estos peligrosos animales. Para su eliminación no se puede emplear ningún tipo de veneno, ya que si un topo envenenado queda en un lecho, las lombrices que se lo comen morirán también envenenadas. La solución más idónea consiste en colocar trampas para topes en los lugares de acceso en donde se detecta su presencia. Otra solución, más costosa, consiste en extender sobre la base de los lechos una malla metálica galvanizada; esta malla será 50 centímetros más ancha que la anchura de la base de los lechos, con el fin de poder doblar los bordes y formar con ellos unas paredes perimetrales de 25 centímetros de altura. Carlos Ferruzzi 1987.

Los pájaros remueven con las patas la superficie de los lechos y se comen las lombrices que encuentran. Cuando llegan a constituir un peligro grave, los lombricultores se libran de ellos cubriendo los lechos con unas mallas de material plástico. Por otro lado, estas mallas sombrean algo durante el verano, lo que contribuye a mantener la humedad de los lechos. Carlos Ferruzzi 1987.

Las hormigas son dañinas porque se comen los azúcares del alimento de las lombrices. Para eliminarlas se puede rociar con un insecticida a base de piretrinas una banda perimetral a cierta distancia de los lechos, para evitar que el insecticida dañe a las lombrices. Carlos Ferruzzi 1987.

7.4. EXPLOTACIÓN ECOLÓGICA

Algunas industrias producen residuos orgánicos, cuya eliminación o transformación es difícil o costosa. En estos casos la lombriz roja puede utilizarse ventajosamente para la eliminación de estos residuos, a la vez que se obtiene una rentabilidad por su explotación. Carlos Ferruzzi 1987.

La transformación de residuos sólidos urbanos por medio de la lombriz roja resulta menos costosa que cuando se utilizan depuradores o incineradores, por lo que puede ser interesante en núcleos urbanos pequeños. Carlos Ferruzzi 1987.

Para el aprovechamiento de residuos sólidos urbanos es preciso separar previamente los productos que la lombriz no come: metales, vidrios, plásticos, etc. Se tritura el producto, lo que facilita su ingestión por la lombriz, y a continuación se deja fermentar en montones de 70 a 80 centímetros de altura. El producto resultante de esta fermentación, llamado «compost», se distribuye a las lombrices de un modo semejante a como se hacía con el estiércol. Carlos Ferruzzi 1987.

El humus obtenido de estas explotaciones es de baja calidad, por su escaso contenido en flora bacteriana y porque a veces contiene una apreciable cantidad de metales pesados. Este humus de baja calidad y, por tanto, de poco precio, puede emplearse en floricultura y en cultivos de plantas industriales, cuyos productos no ingieren ni el hombre ni los animales. Carlos Ferruzzi 1987.

La lombriz alimentada con sustancias residuales que contienen metales pesados acumula en su organismo unas elevadas concentraciones de estos elementos e incrementa los niveles de éstos en el humus. El suelo abonado con este humus acumula metales pesados, aunque parece ser que el riesgo de acumular cantidades peligrosas deriva de las aplicaciones muy continuadas. Estos suelos sólo deben utilizarse para cultivos que no se ingieren, ya que los metales pesados pasan del suelo a las plantas, de éstas a los animales herbívoros y de éstos a los carnívoros, sin eliminarse a lo largo de este proceso, sino que, por el contrario, se

van acumulando cada vez en mayor concentración a lo largo de toda la cadena, llegando al final al hombre, que resulta el más perjudicado. Carlos Ferruzzi 1987.

En la explotación ecológica de la lombriz, aparte de los problemas planteados en relación con los metales pesados, surge el posible impacto ambiental que puede causar la competencia entre la lombriz roja y la lombriz común autóctona y que ya se mencionó al tratar de la incorporación directa de la lombriz roja a los terrenos estériles. Se requiere un estudio a fondo sobre el comportamiento mutuo entre ambas lombrices para que la posible introducción y proliferación de la lombriz roja en ciertos medios no cause efectos negativos sobre la lombriz común y otras especies autóctonas, tal como ya ha ocurrido con la introducción del cangrejo de las marismas, el visón americano y algunas especies vegetales. Carlos Ferruzzi 1987.

7.5. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ADN

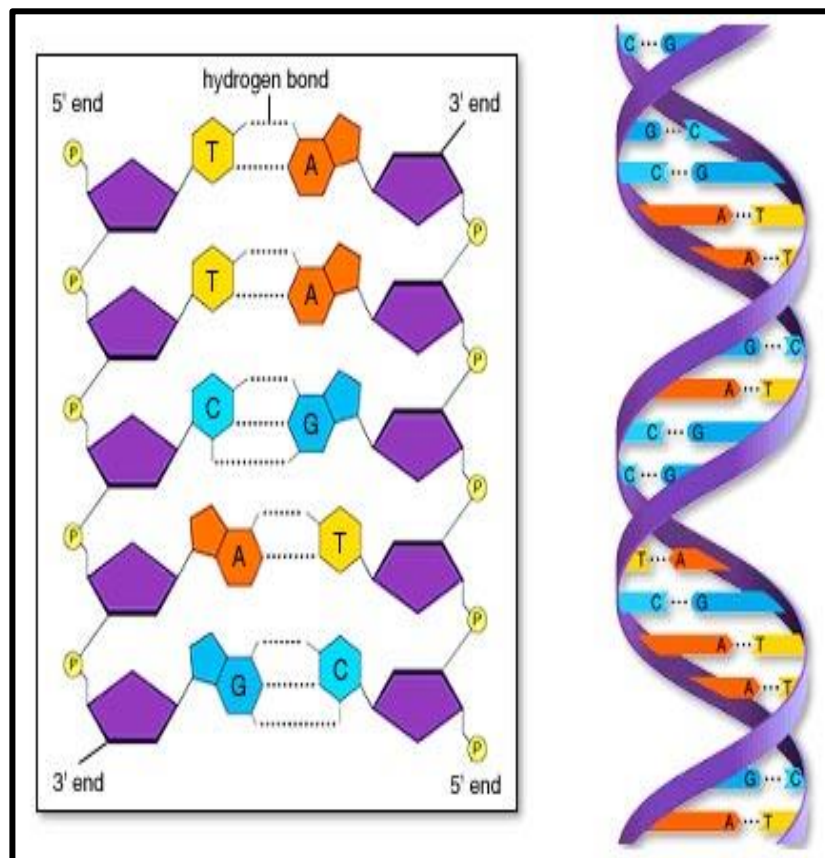


Figura 3. Modelo de estructura de ADN

La molécula de ADN es una larga doble hélice enrollada sobre sí misma, semejante a una escalera de caracol. En ella, dos ramales compuestos de moléculas de azúcar (desoxirribosa) y fosfatos, se conectan gracias al apareamiento de cuatro moléculas denominadas bases, las cuales forman los eslabones de la escalera. Estas cadenas formadas por cuatro nucleótidos distintos, compuestos además por un azúcar (la desoxirribosa), un ácido fosfórico, y una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T).

En los eslabones, la adenina se aparea con la timina y la guanina con la citosina. Así un enlace de hidrógeno. Un gen es segmento de un ADN, que tiene una determinada función y está constituido por una secuencia específica de bases.

7.5.1 REPLICACIÓN DEL ADN.

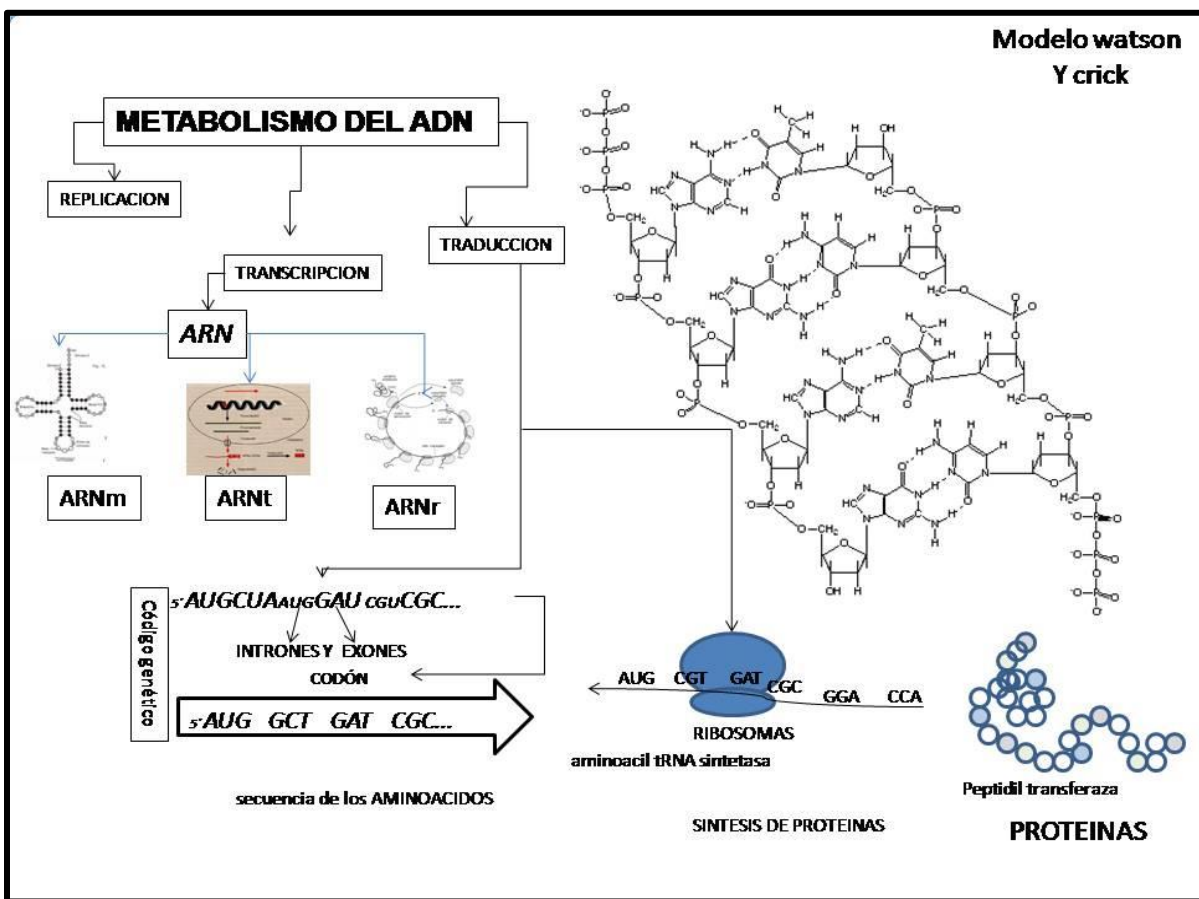


Figura 4. Modelo de replicación de DNA

Conociendo el orden de colocación de cada una de las bases en una de las cadenas, se puede predecir el de la otra. Gracias a esto es posible la replicación del ADN: cuando los dos filamentos de la espiral se separan, a cada uno de ellos se van enfrentando las correspondientes bases nitrogenadas, construyéndose así a partir de una molécula de ADN dos idénticas a ellas. (Hansson, 2002).

7.6 ESTRUCTURA DE LOS INTEGRONES

Todos los integrones se componen de una plataforma estable, que contiene los elementos funcionales necesarios para el funcionamiento del sistema, asociado con un conjunto variable de cassettes genéticos que codifican funciones accesorias. (Hansson, 2002).

7.6.1 INTEGRONES DE CLASE I

Los integrones de clase 1 son los más extendidos y de importancia clínica, ya que se detectan en el 22% a 59% de las bacterias Gram-negativas pertenecientes a aislamientos clínicos (Levesqué, 1995), y también han sido identificados en bacterias Gram-positivas en algunas ocasiones (Nandi, 2004). Como tales, constituyen los principales modelos experimentales de integrones. Son asociados con transposones funcionales y no funcionales derivados de Tn402, que puede integrarse también en las grandes transposones tales como Tn21. Los integrones de clase 2 se asocian exclusivamente con derivados del Tn7, y muestran una docena de diferentes arreglos de cassette (Ramírez, 2010). El gen de la integrasa de integrones de clase 2, *intI2*, por lo general contiene una mutación sin sentido en el codón 179 que produce proteínas no funcionales. Hansson, 2002.

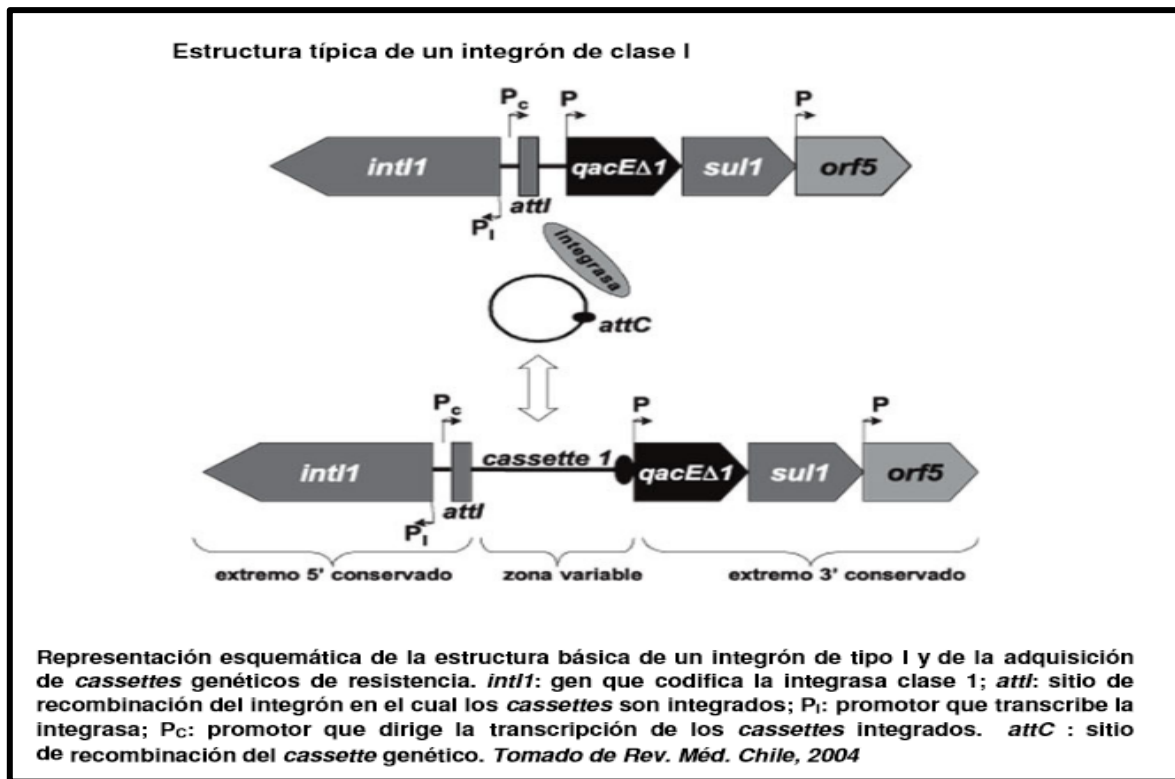


Figura 5. Estructura típica de un integrón de clase I

7.6.2 LA PLATAFORMA DEL FUNCIONAMIENTO

La enzima presente en el integrón que se encarga de la integración y escisión de los diferentes genes se conoce con el nombre de integrasa y se trata de una tirosina recombinasa tipo específico (Stokes, 1989). Ahora, la integración de estos genes se realiza en una región concreta adyacente a la integrasa que se conoce como el sitio *attI* (Jove, 2010). Los genes que pueden ser integrados o escindidos por la acción de la integrasa reciben el nombre de genes *cassette* y constituyen una porción del integrón que se conoce como región variable.

Los *cassettes* genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo (*orf*), o región codificante (*gen*) (Recchia, 1997). Contienen un sitio llamado *attC* o elemento de 59 pb que es reconocido por la integrasa y que hace posible la integración. (Partridge, 2009). Aunque se considera que los *cassettes* genéticos son elementos móviles (Recchia, 1997), no codifican enzimas u otros productos

involucrados en su propia movilización (Hall 1995). Estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el cassette desde un integrón (Partridge, 2009). La inserción específica de sitio de los cassettes genéticos al interior de la región variable de los integrones ha sido solamente detectada en las células que expresan la actividad de la integrasa. Esto indica que esta recombinasa es necesaria para la integración de los cassettes, predominantemente dentro del sitio attI del integrón (Caratolli, 2001), aunque también es posible la recombinación entre dos sitios attC (Collis C.1995).

La integrasa reconoce los sitios de integración presentes en el integrón y en el gen en cassette. Este reconocimiento genera una especificidad en la orientación de los cassettes genéticos permitiendo que la transcripción pueda realizarse desde un promotor común localizado en el extremo 5'CS de los integrones, cuya secuencia nucleotídica es altamente conservada y en el cual pequeñas variaciones afectan la fuerza de transcripción del promotor. Puede suceder que una pequeña alteración en el promotor no permita la expresión de un gen en cassette dentro del integrón o la permita en niveles muy bajos haciendo que la bacteria aparezca fenotípicamente susceptible, aunque es potencialmente resistente por poseer el gen que codifica la resistencia (Mazel, 2006).

Es así que la presión que ejerce el uso de un antibiótico específico puede seleccionar las cepas con promotores más fuertes y capaces de expresar el gen, determinando la resistencia de las bacterias al antibiótico (Collis C. 1995). El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un cassette genético de resistencia, depende de su posición en el integrón, más cercana o lejana del promotor común (Collis C. 1995). Está demostrado que las bacterias manifiestan niveles de resistencia más elevados cuando el gen de resistencia se ubica en el primer cassette, esto es, muy cercano al promotor y estos niveles se reducen a medida que los genes están en cassettes posteriores, río abajo del promotor.

En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes qacED1, sul1 y orf5 que codifican

resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y una proteína con función desconocida (Caratolli, 2001). Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de cassettes genéticos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionados con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o deleción de algunos genes o secuencias de inserción.

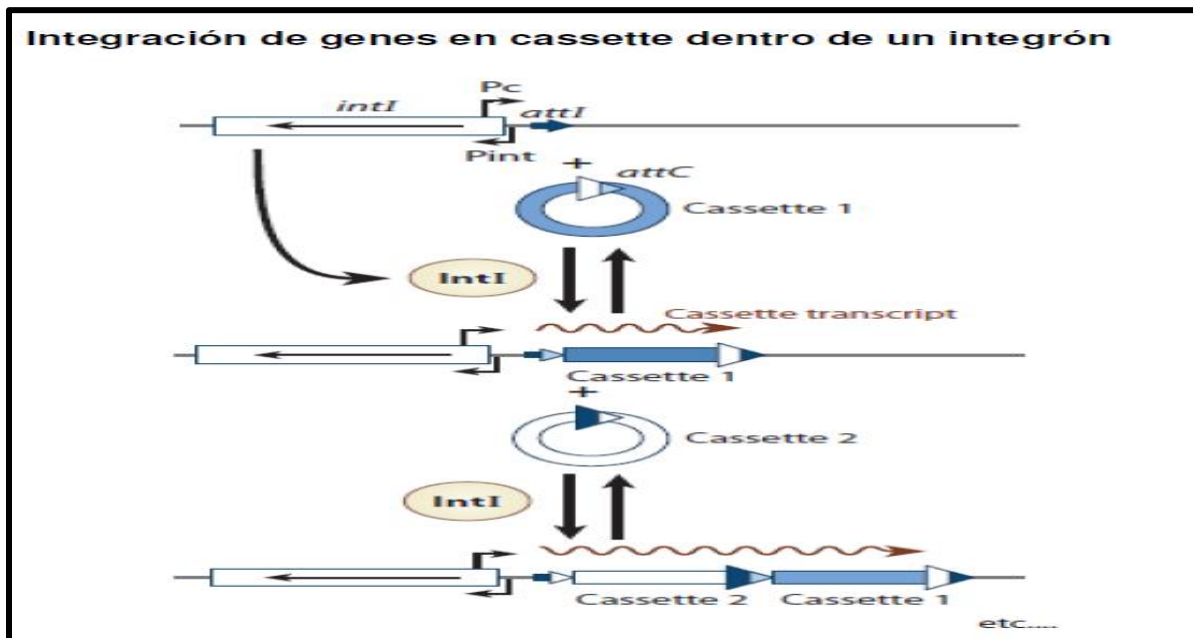


Fig. 6. Integración de genes en cassette dentro de un integrón

7.6.3 DIFERENTES TIPOS DE INTEGRONES

A pesar de que presentan una organización similar, los integrones móviles (IM) e integrones cromosomales (IC) muestran características distintivas que sustentan diferentes historias evolutivas (Mazel, 2006). Los integrones móviles (IM) corresponden a las plataformas funcionales que están físicamente asociados con los elementos móviles del ADN (Transposones), y pueden ser transportados por plásmidos conjugativos. Estos elementos se utilizan como vehículos genéticos naturales, lo que permite la transmisión eficiente entre las bacterias de la misma especie o especies diferentes (White, 2001). Los IM contienen sólo unos pocos

cassettes que parecen ser de orígenes heterogéneos y se recogieron probablemente en diferentes contextos genómicos. (White, 2001).

La región variable más grande identificada hasta ahora se compone de ocho genes en cassette (Naas, 2001). La heterogeneidad de los cassettes esta atestiguada por los codones inconsistentes, los orfs que codifican y por la secuencia y la diversidad de tamaño de sus sitios attC.

En contraste con su aparente origen heterogéneo, los genes en cassette muestran una homogeneidad funcional sorprendente, ya que la mayoría se relaciona con la resistencia a antibióticos. Hasta al momento han sido identificados más de 130 genes en casete que codifican varios genes de resistencia a antibióticos (Partridge, 2009).

En conjunto, 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 (Partridge, 2009). Sólo unos pocos IM cassettes identificados tienen funciones desconocidas. Cinco clases diferentes de IM se han definido hasta la fecha, sobre la base de la secuencia de los integrasas codificadas (40% -58% de identidad). Aunque sólo los tres primeros han sido históricamente involucrados en la propagación de la fenotipos de multiresistencia (Mazel, 2006).

Los integrones de clase 3 también se cree que se encuentran en un transposón (Collis C. 2002) y son menos frecuentes que los de clase 2. Los otros dos tipos de IM se encuentran en especies de *Vibrio*. La integrones de clase 4 está integrados en un subconjunto de elementos de integración y de conjugación en *Vibrio cholerae* (Hochhut, 2001). El integrón de clase 5 está situado en un transposón compuesto en el plásmido pRSV1 de *Alivibrio salmonicida* (Sorum, 1992).

Los integrones de Clase 1 y clase 3 que no están asociadas con la resistencia han sido recuperados en bacterias del medio ambiente (Gillings; 2008). En todos los

casos, estos genes en cassette tienen funciones desconocidas (Márquez, 2008.). Estos datos indican que los IM no están específicamente dedicados a la resistencia a los antibióticos, pero es probable que en términos generales estén involucrados en la mediación de la adaptación bacteriana.

La prevalencia de las funciones de resistencia refleja el éxito evolutivo de los integrones en estas adaptaciones.

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

○ VERMICOMPOSTA

Procedimiento:

Eisenia foetida se crío en una cama de suelo el cual estaba compuesto por: 50% de estiércol de conejo 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 y humedad fue por cada 7 días.

○ PREPARACION 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.

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, con una concentración de NaCl al 6% a un PH de 5 y 9, incubándolos a 28 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

○ **MEDIO DE CULTIVO SOLIDO (AGAR ROJO FENOL)**

Preparación de un medio sólido en placa.

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 horas.

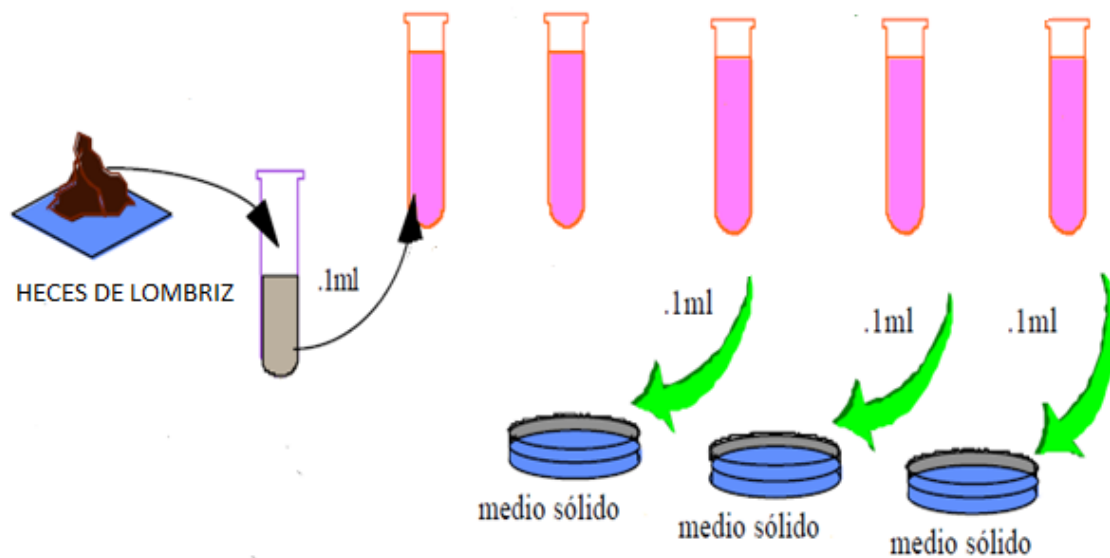


Figura 7. Preparación de diluciones para sembrar en cajas petri

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

○ **TECNICA ESTRIA CRUZADA**

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.

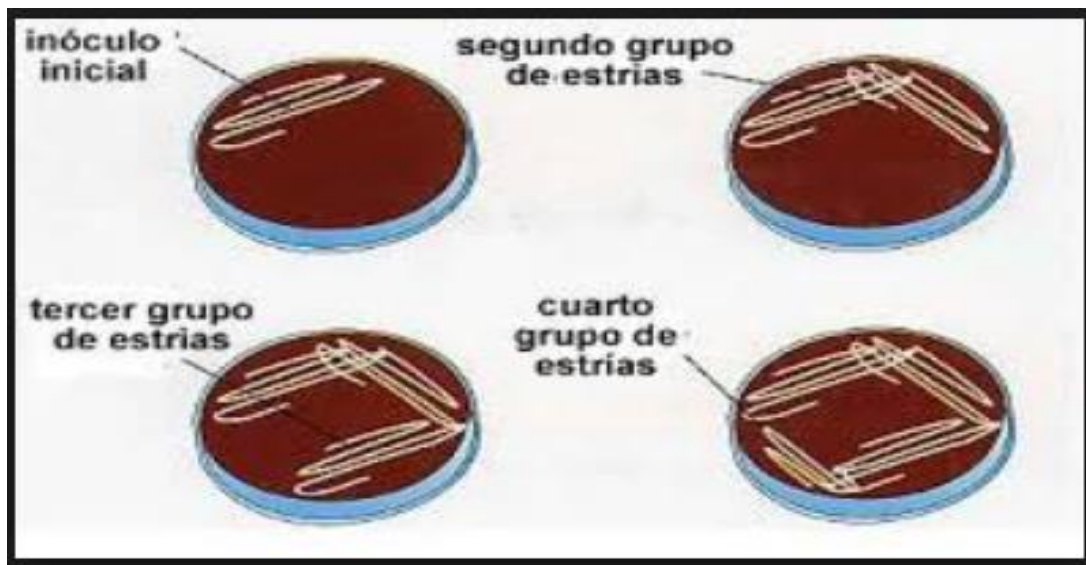


Figura 8. Estría cruzada de medios

○ 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.



○ **ANALISIS MACROSCOPICO DE LAS BACTERIAS AISLADAS**

Para el análisis macroscópico de las cepas aisladas en medio de cultivo en placas petri, incubadas a temperatura ambiente, durante 24 horas, se determinaron las siguientes características: tamaño, forma, borde, color, elevación.

○ **ANALISIS MICROSCOPICOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS**

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 trata 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.

○ **OBTENCION DE LAS BACTERIAS PARA LA EXTRACCION DEL DNA**

En tubo eppendorf se agregó 5µl de glicerol y 5µl de antibiótico (ciprofloxacino y trimetropima) con la finalidad de inhibir a las bacterias.

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 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 5 µl de agua estéril y se tomó un 1 µl del medio de cultivo.

El aislamiento de ADN genómico de bacterias se basa en la liberación eficiente del ADN genómico por un buffer de lisis. Después se separó el ADN 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 40 µl de lizocima 10 mg/ml.
- 2.- Adicionar 1 ml de SDS 10% y 0.5 g 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 500 µl 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 el micro centrifugador para bajar el etanol de las paredes del tubo y con un micro pipeta de 200µl quitar el exceso de etanol.
12. Dejar secar la pastilla (aproximadamente 10 minutos) y re-suspender en 50µl de agua estéril.

○ CONFIRMACIÓN DE LA CALIDAD DE EXTRACCION DEL DNA (ELECTROFORESIS)

PREPARACIÓN DE GEL 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.

9. RESULTADOS

ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LA VERMICOMPOSTA

La humedad de la vermicomposta debe mantenerse estable, entre 60% a 75 %. Factor importante porque influye en la fecundidad y desarrollo de los cocones y el sustrato se mantiene dentro de este rango por lo tanto el porcentaje de humedad es **73.69%**.

El pH que presenta la vermicomposta al cual se le regaba agua de pescado es de 7.13 y el que fue regado con agua corriente tiene un pH de 7.14.

CONDUCTIVIDAD

La conductividad que obtuvo la vermicomposta con agua de pescado fue de 7.72 dSm^{-1} y de agua corriente fue de 7.69 dSm^{-1}

CRA (Capacidad de Retención de Agua)

Cantidad de muestra = **25 grs.**

Volumen de agua no retenido por la muestra = **17 ml.**

Por lo tanto Volumen retenido por la muestra es = **8ml = 32% de capacidad de retención de Agua de la vermicomposta.**

TEXTURA

Primer registro de temperatura 25°C, según la tabla de corrección de la temperatura regido por la Norma Oficial Mexicana **NOM-021-RECNAT-2000.Método AS-09será 1.98.**

TABLA 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

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

$$\% \text{ Arena} = 100 - (37.89 + 1.98/50) \times 100$$

$$\% \text{ Arena} = 20.26\%$$

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 2.01.

$$\% \text{ Arcilla} = (16.9 + 1.98/50) \times 100$$

$$\% \text{ Arcilla} = 37.76\%$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - (20.26 + 37.76) = 41.98\%$$

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.

SERIES DE TUBOS POR SUSTRATO

Representa el número de réplicas que se realizaron para el experimento, de los cuales nueve muestras fueron para el tratamiento de agua de pescado y nueve para el tratamiento de agua corriente.

CRECIMIENTO BACTERIANO EN NaCl AL 6% con pH 5.

De las réplicas que se realizaron en el tratamiento humectado con agua de peces se obtuvo mayor crecimiento bacteriano ya que de nueve, en seis tubos de estos presentaron crecimiento bacteriano, mientras que en los tratamientos humectados con agua potable de nueve tubos, solo uno presentó crecimiento bacteriano.

ANTIBIOTICOS TRIMETROPRIMA Y CIPROFLOXACINO EN CULTIVOS DE TUBOS Y PLACAS CON PH 9.

Los tubos de caldos fueron preparados con peptona, NaCl y extracto de levadura, a cada tubo se le adiciono 5 ml del medio y 5 µl del antibiótico Trimetroprima (24) y Ciprofloxino (20) esto fue adicionado para ambos tratamientos humectados con agua de pescado y agua potable. La adición de antibióticos 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.

ANÁLISIS MACROSCÓPICOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Observaciones macroscópicas del medio de cultivo

En el examen macroscópico se observó forma circular, con una elevación convexa, color crema, borde redondeado y olor pronunciado “fétido”.

ANALISIS MICROSCOPICOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Durante la observación al microscopio se observó las siguientes formas bacterianas: en forma de cocos, racimo y alargadas.

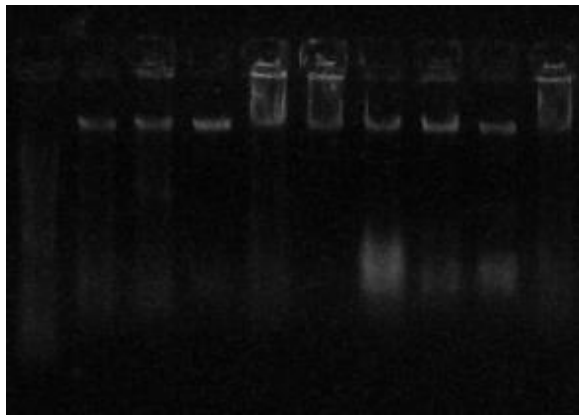
La tinción de gram se realizó con el objetivo de saber la morfología bacteriana presentes en las muestras con dos tratamientos diferentes, agua corriente y agua de pescado con sustrato de heces de cabra.

En el tratamiento humectado con agua de pescado, al realizar la tinción de Gram se pudo observar microscópicamente que en los nueve, cuatro muestras que fueron tomadas de los tubos estos fueron gram positivo esto se define porque al observarse al microscopio estos mostraron una coloración morada lo cual nos

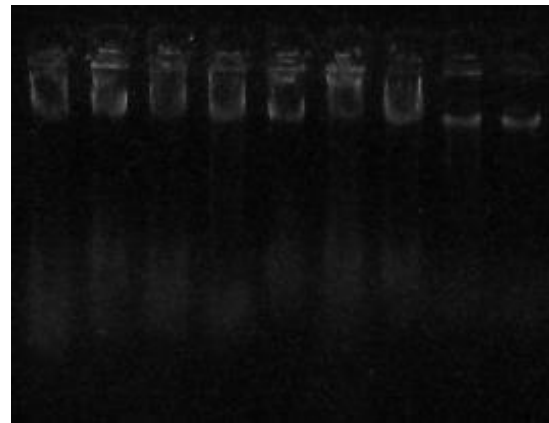
indica que la pared celular de las bacterias posee una gruesa capa de peptidoglicano y las otras cinco muestras fueron gram negativo ya que estos se tiñeron de color rosa o rojo lo cual nos indica que son gram negativas ya que estas en su capa peptidoglicano son delgadas y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas.

En el tratamiento humectado con agua potable, al realizar la tinción de Gram se observó que de los nueve tubos siete salieron gram negativo y solamente dos gram positivos.

EXTRACCIÓN Y COMPROBACIÓN DEL DNA



a)



b)

Figura 9. Resultados de la extracción del DNA bacteriano en gel de agarosa por medio de electroforesis (a) tratamiento con agua de corriente y (b) tratamiento con agua pescado.

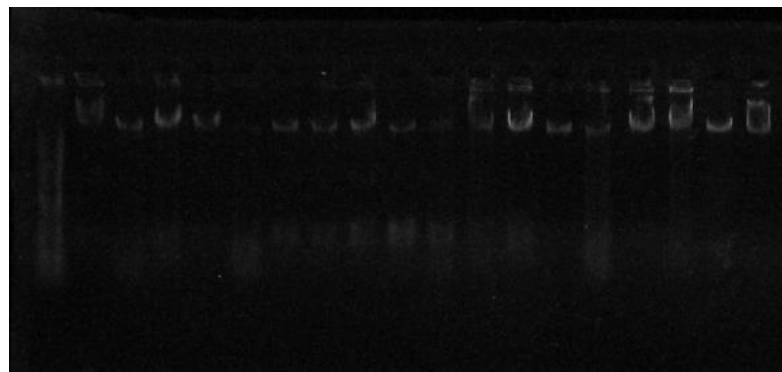


Figura 10. En esta imagen se observa las diferentes muestra de extracción de DNA bacteriano utilizando un gel de agarosa al 0.8%.

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. Durante el análisis del efecto que tiene el sustrato de heces de cabra con dos tratamientos de humectación sobre el crecimiento de la lombriz

Para el estudio del efecto de las heces de conejo 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 trato digestivo de la lombriz crecen mayormente a un pH de 9 obteniéndose un mayor rendimiento de número 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 visualizó 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.

MEDICIONES DE LONGITUD DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* UTILIZANDO COMO SUSTRATO HECES DE CONEJO CON DOS TRATAMIENTOS AGUA CORRIENTE Y AGUA DE PESCADO.

Análisis del crecimiento de las lombrices las cuales fueron sometidas con dos tratamientos de humectación, como se muestra en la figura 10.

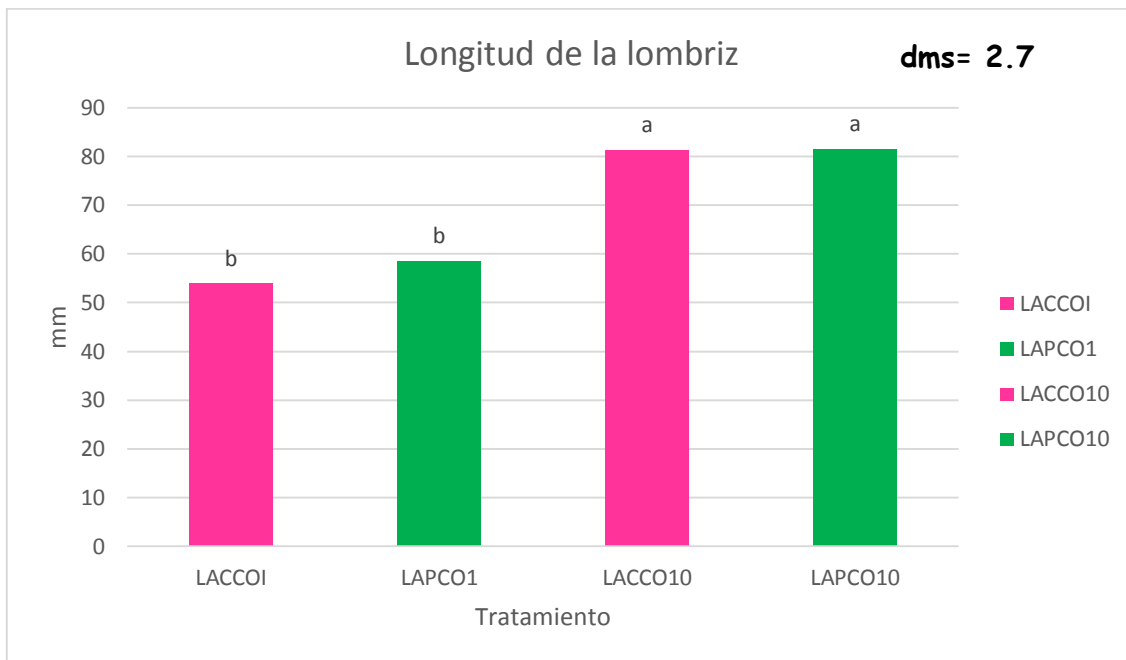


Fig 11. Análisis de ANOVA simple para la variable Longitud de lombriz, según prueba de Tukey < 0.05 , con el programa Statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.

Las lombrices que fueron alimentadas con heces de conejo durante 155 días humectadas con agua corriente mostraron una diferencia significativa en la variable longitud en las lombrices comparadas con el de agua pescado. Sin embargo, el sustrato de heces de conejo humectadas con agua corriente a los 155 días derivó en un 0.33% mayor longitud que el tratamiento de humectación de agua pescado, un 28% mayor longitud para el mismo tratamiento al inicio del experimento y un 34% mayor longitud que el tratamiento con agua de pescado al inicio del experimento.

MEDICIONES DE DIAMETRO DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* UTILIZANDO COMO SUSTRATO HECES DE CONEJO CON DOS TRATAMIENTOS AGUA CORRIENTE Y AGUA DE PESCADO.

Análisis del diámetro de las lombrices las cuales fueron sometidas con dos tratamientos de humectación, como se muestra en la figura 11.

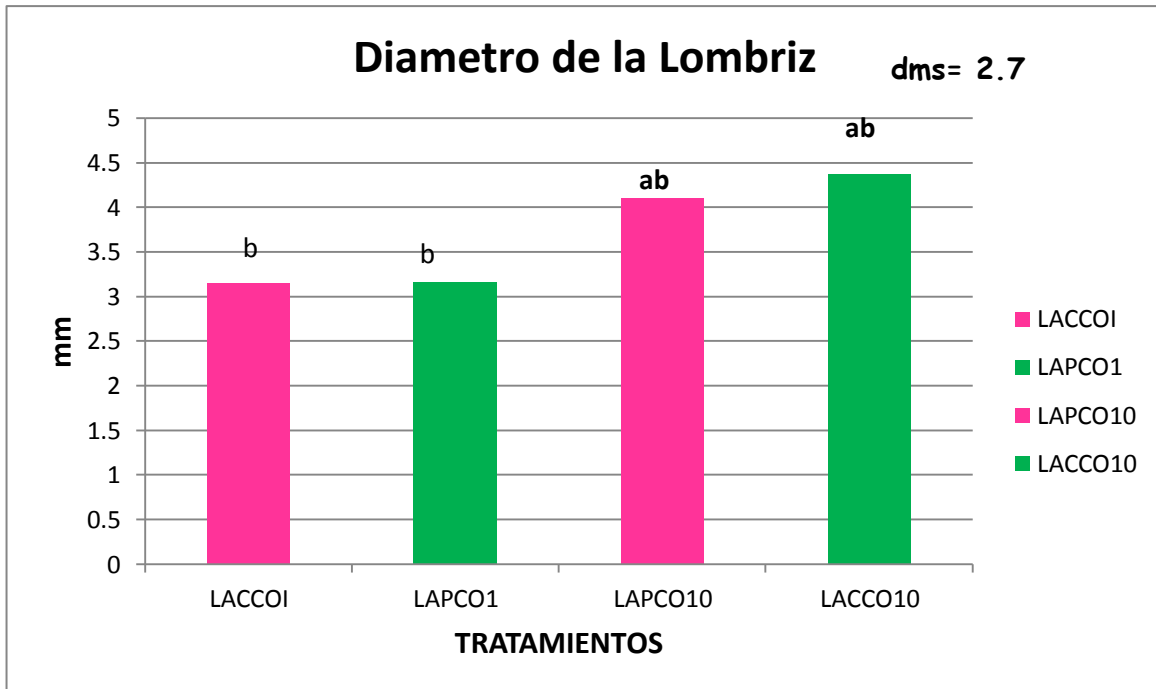


Fig 12. Análisis de ANOVA simple para la variable diámetro de lombriz, según prueba de Tukey < 0.05 , con el programa Statgraphic. Letras iguales no hay diferencia significativa.

Las lombrices que fueron alimentadas con heces de conejo durante 155 días y regadas con agua de peces, mostraron un mayor diámetro, conforme el tiempo las lombrices tienden a crecer por el consumo de nutrientes contenidos en las heces de conejo y en el agua de peces.

Las lombrices alimentadas a base de heces de conejo y agua de peces a los 155 días, mostraron un 6.25 a 28 % más de diámetro que las lombrices de los otros tratamientos.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según García-Pérez y Rafael E. 2006 los resultados que se obtienen serán positivos siempre y cuando se determinen las propiedades físicas y químicas del suelo donde se van a poner las lombrices así como la calidad de los nutrientes que estas les daremos, en nuestro caso los nutrientes que se les proporciono fueron los óptimos, teniendo en cuenta las dos variables a utilizar que fue agua de pescado y agua corriente con el fin de determinar cuál de estas les proporcionaría mayor nutrientes y poder definir el mejor nutrientes para las lombrices.

En cuanto a los resultados obtenidos estos son bastantes favorables en cada paso que se realizó con lo que respecta al conteo de lombrices estas fueron favorables al hacer la relación de inicio a fin, esto se debe a propiedades nutricionales propias del sustrato así como también las características de tipo humectación que fueron: agua corriente y agua de pescado.

Obteniéndose un dms de 7 con respecto a la longitud de 2.7 respectivamente para ambos tratamientos.

11. CONCLUSIÓN

En este proyecto se alcanzaron las metas y objetivos planteados desde el principio de nuestro proyecto ya que logramos estandarizar la técnica y esto lo vimos reflejados al momento de realizar la electroforesis obteniendo una lectura precisa de la extracción de ADN como se mostró en los resultados.

A demás el aislamiento de las cepas se realizó correctamente, llevándose a cabo en las cajitas petris y dándole un tratamiento adecuado con antibióticos para que se llevara a cabo el aislamiento.

Y finalmente la extracción de ADN como ya mencione tuvo resultados positivos ya que no hubo ningún fallo al momento de la lectura, quedando demostrado al momento de hacer una PCR para comprobar y corroborar resultados.

En cuanto al sustrato que se le dio a las lombrices se puede concluir que el excremento de conejo es bastante bueno para las lombrices, teniendo un desarrollo y crecimiento favorables.

12. BIBLIOGRAFIA

- Caratolli, 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* 32, 243–259.
- Carlos Ferruzzi. 1987. DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION Y CAPACITACION AGRARIAS, Servicio de Extensión Agraria, Madrid, *Manual de Lumbricultura*, Ediciones MundiPrensa.
- Collis C. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-62.
- Collis C. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol.* 184:3017–3026.
- Hansson, 2002. Intl2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 2002; 184:1712–1721.
- Hochhut, 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2991–3000.
- Levesqué, 1995. PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-91.
- Márquez, 2008. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J Antimicrob Chemother.* 58:1133–1138.
- Mazel, 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620.
- Naas, 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*; 183:235–249. 60.
- Nandi, 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:7118-7122.
- Partridge, 2009. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 45: 1263-70.

Ramírez, 2010. Erythromycin esterase gene *ere* (A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother*; 47:3326-3331.

Sorum, 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother*; 36:611–615.

Stokes, 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol. Microbiol* 1989; 3: 1669-83.

White, 2001. Integrons and gene cassette in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2658-61.

13. ANEXOS

ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LA VERMICOMPOSTA

HUMEDAD CONEJO

Formula:

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

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)

$$\frac{15 \text{ gr} - 8.81 \text{ gr}}{8.81 \text{ gr} - 0.41 \text{ gr}} = \frac{6.19}{8.40} = 0.7369 \times 100 = \mathbf{73.69 \%}$$

pH

	Agua pescado	Agua Corriente
Conejo	7.13	7.14

CONDUCTIVIDAD

	Agua pescado	Agua Corriente
Conejo	7.72 dSm ⁻¹	7.69 dSm ⁻¹

CRA (Capacidad de Retención de Agua)

Cantidad de muestra = **25 grs.**

Volumen de agua no retenido por la muestra = **17 ml.**

Por lo tanto Volumen retenido por la muestra es = **8ml = 32% de capacidad de retención de Agua de la vermicomposta.**

SERIES DE TUBOS POR SUSTRATO

HECES DE CONEJO	
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO	
ID	REPLICA
28	1
29	1
30	1
31	2
32	2
33	2
34	3
35	3
36	3
HECES DE CONEJO	
TRATAMIENTO: AGUA CORRIENTE	
ID	REPLICA
64	1
65	1
66	1
67	2
68	2
69	2
70	3
71	3
72	3

Cuadro 1. Serie de tubos por sustrato

En este cuadro se muestra el número de réplicas que se realizaron en la extracción de DNA.

CRECIMIENTO BACTERIANO EN NaCl AL 6% con pH 5.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS	
DE LAS HECES DE LOMBRIZ (SUSTRATO HECES DE CONEJO)	
CRECIMIENTO BACTERIANO (NaCl al 6% pH 5)	
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO	
28	si
29	si
30	si
31	no
32	si
33	si
34	no
35	no
36	si
TRATAMIENTO: AGUA CORRIENTE	
TUBOS	crecimiento
64	no
65	no
66	si
67	no
68	no
69	no
70	no
71	no
72	no

Cuadro 2. Crecimiento bacteriano en NaCl al 6% con pH 5.

En este cuadro muestra el crecimiento bacteriano en NaCl al 6% con un pH 5 con los dos tratamientos: agua de pescado y agua corriente.

ANTIBIOTICOS TRIMETROPRIMA Y CIPROFLOXACINO EN CULTIVOS DE TUBOS Y PLACAS CON PH 9.

CULTIVO EN TUBOS Y EN PLACA PH DE 9		
HECES DE CONEJO		
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)		
ID	Tubo 24 (Trimetoprima)	placas
28	(+)	(+)
29	(+)	(+)
30	(+)	(+)
31	(+)	(+)
32	(+)	(+)
33	(+)	(+)
34	(+)	(+)
35	(+)	(+)
36	(+)	(+)
TRATAMIENTO: AGUA CORRIENTE		
64	(+)	(+)
65	(+)	(+)
66	(+)	(+)
67	(+)	(+)
68	(+)	(+)
69	(+)	(+)
70	(+)	(+)
71	(+)	(-)
72	(+)	(-)

HECES DE CONEJO		
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)		
ID	Tubo 20 (ciprofloxacino)	placas
28	(+)	(+)
29	(+)	(+)
30	(+)	(+)
31	(+)	(+)
32	(+)	(+)
33	(+)	(+)
34	(+)	(+)
35	(+)	(+)
36	(+)	(+)
TRATAMIENTO: AGUA CORRIENTE		
64	(+)	(+)
65	(+)	(+)
66	(+)	(+)
67	(+)	(+)
68	(+)	(+)
69	(+)	(+)
70	(+)	(+)
71	(+)	(+)
72	(+)	(+)

Cuadro 3. Antibióticos trimetoprima y ciprofloxacino en cultivos de tubos y placas con pH 9.

En este cuadro se muestran los resultados obtenidos con los antibióticos en cultivos de tubos y placas con un pH de 9.

ANALISIS MICROSCOPICOS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

OBSERVACION MICROSCOPICA DE			
BACTERIA OBTENIDAS DE HECES DE LOMBRIZ <i>EISENIA FOETIDA</i>(SUSTRATO " GANADO CONEJO")			
TRATAMIENTO: AGUA DE PESCADO (ESTANQUE)			
Núm. De Tubo	Gram +		Gram -
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
TRATAMIENTO: AGUA CORRIENTE			
64			
65			
66			
67			
68			
69			
70			
71			
72			

Cuadro. 4. Análisis macroscópicos de las bacterias aisladas

En este cuadro se observa los resultados obtenidos en el análisis microscópico.

MEDICIONES DE LONGITUD DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* UTILIZANDO COMO SUSTRATO HECES DE CONEJO CON DOS TRATAMIENTOS AGUA CORRIENTE Y AGUA DE PESCADO.

TRAT	Media
LACCOI	53.897
LAPCO1	58.4857
LACCO10	81.275
LAPCO10	81.538

Cuadro. 5

MEDICIONES DE DIAMETRO DE LA LOMBRIZ *Eisenia foetida* UTILIZANDO COMO SUSTRATO HECES DE CONEJO CON DOS TRATAMIENTOS AGUA CORRIENTE Y AGUA DE PESCADO.

TRAT	Media
LACCOI	3.15333
LAPCO1	3.16
LAPCO10	4.1
LACCO10	4.37333

Cuadro. 6