

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

OBED ÁLVAREZ GONZÁLEZ

CON EL TEMA:

**“BIODIVERSIDAD GENÉTICA DE ENDOBACTERIAS ASOCIADAS A
LA LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia foetida*”**

MEDIANTE:

**OPCIÓN I
(TESIS PROFESIONAL)**

**Director de tesis
Dr. Reiner Rincón Rosales**

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS,

FEBRERO DE 2016

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Quien en su multiforme gracia y por quien todas las cosas subsisten ha permitido que culmine una de mis metas, reconociendo que sin su ayuda y favor hubiese logrado nada.

A MIS PADRES

Quienes han sido los principales generadores de mi acervo, son maestros, amigos, ejemplos a seguir, cuyas acciones y enseñanzas han sido plasmadas en páginas que tienen nombre y apellido. No lo hubiese logrado sin ustedes.

A MI FAMILIA

Ustedes son la base fundamental del porqué de mi esfuerzo, mi apoyo incondicional en los momentos buenos y malos. Gracias por todo ese amor incondicional.

A MIS ASESORES

Dr. Reiner Rincón, por su gran apoyo, de principio a fin, su tiempo, dedicación y orientación en el proyecto fue de inapreciable valor, Dr. Juan José Villalobos y Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo por los aportes y correcciones hechos a mi trabajo, excepcionales y de gran ayuda para la estructura del mismo.

A mis profesores, encargados de mi formación académica, al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, por brindarme la oportunidad de ser alumno de esta gran institución, a mi amigo IBQ. Adalberto Zenteno Rojas por todo el apoyo brindado en este tiempo.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Lista de Figuras	iii
Lista de cuadros	iv
Resumen	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Aspectos biológicos de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>.....	9
2.1.1 Clasificación Taxonómica de la lombriz de tierra <i>Eisenia Foetida</i>.....	10
2.1.2 Ecología de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	11
2.1.3 Uso e importancia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	12
2.1.3.1 Vermicomposta	14
2.2 Microorganismos asociados a la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	16
2.2.1 Hongos.....	17
2.2.2 Levaduras	19
2.2.3 Bacterias endosimbiontes	20
2.3 Estudio de la biodiversidad genética de bacterias endosimbióticas	25
2.3.1 Amplificación de genes cromosomales.....	26
2.3.2 Huellas genómicas	29
2.3.3 Secuenciamiento genético	30
2.3.4 Análisis Filogenético.....	31
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo General	35
4.2 Objetivos Específicos	35
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1 Cultivo y reproducción de la lombriz de suelo <i>Eisenia foetida</i>.....	36
5.2 Aislamiento y cultivo de bacterias asociadas al intestino de la lombriz de suelo <i>Eisenia foetida</i>.....	37
5.1.1 Ubicación del experimento.	37

5.2.1	Aislamiento y cultivo de cepas.....	37
5.3	Extracción de ADN y análisis de huellas genómicas de bacterias endosimbióticas aisladas de <i>E. foetida</i>	38
5.3.1	Extracción de ADN genómico.....	38
5.3.2	Huellas genómicas PCR_ERIC (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>).....	39
5.3.3	Amplificación del gen 16S rARN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	40
5.3.4	RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	40
5.4	Secuenciamiento y Análisis filogenético.	41
5.5	Análisis estadístico de datos.	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1	Cepas aisladas y su morfología macroscópica.....	42
6.2	Características genómicas del ADN extraído de Endobacterias de <i>Eisenia foetida</i>	44
6.3	Huellas genómicas ERIC_PCR.....	45
6.4	Amplificación del gen 16S ARNr.....	48
6.5	Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).....	49
6.6	Resultado de la purificación del gen 16S ADNr.....	50
6.7.	Análisis filogenético.....	51
7.	CONCLUSIONES	55
8.	BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> (Villegas, 2013).....	10
Figura 2. Clasificación de las lombrices de tierra en base a su hábitat y estrategias de excavación.....	12
Figura 3. Esquema del PCR universal para bacterias y hongos. A partir de la región correspondiente	28
Figura 4. Secuencia ERIC. Secuencia de 127 pares de bases	30
Figura 5. Relaciones filogenéticas entre 21 especies (Dendrobatidae) utilizando secuencias de ADN. (Tello, 2013).....	32
Figura 6 . Área de alimentación y desarrollo de lombrices a base de Peat-Moss y excreta de conejo.....	36
Figura 7. Metodología generalizada del proceso de extracción de ADN genómico de las cepas bacterianas.....	38
Figura 8. Condiciones utilizadas en termociclador, para la amplificación de secuencias consenso, mediante la PCR_ERIC.	39
Figura 9. Condiciones utilizadas en termociclador, para la amplificación del gen 16S rARN, mediante la PCR.	40
Figura 10. Cepas bacterianas creciendo en los diferentes medios de cultivo. A. Medio Agar Soya Trypticaseína B. Agar Rojo Congo C. Caldo Infusión Cerebro Corazón D. Agar Nutritivo.	44
Figura 11. ADN total genómico extraído de endobacterias del Intestino de <i>Eisenia foetida</i> cultivadas en medio AN y analizado por electroforesis.	45
Figura 12. Perfiles genómicas de cepas endobacterias aisladas del Intestino de <i>Eisenia foetida</i> en diferentes medios de cultivo.	47
Figura 13. Amplificación del gen 16S rRNA de endobacterias aisladas del Intestino de <i>Eisenia foetida</i> en gel de agarosa al 1% en TAE 1X.	49
Figura 14. Electroforésis de los fragmentos del gen 16S rARN purificado.	51
Figura 15. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de las endobacterias asociadas al Intestino de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> L. Las cepas están remarcadas en letras negras.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	10
Tabla 2. Representantes de los grupos obtenidos de las pruebas ERIC_PCR.	42
Tabla 3. Grupos formados a partir de los patrones de huellas genómicas obtenidos a partir de ERIC_PCR	46
Tabla 4. Grupos obtenidos a partir de los patrones de restricción de RFLP.....	50

RESUMEN

El suelo es un sistema complejo y heterogéneo que alberga una importante diversidad de organismos y dentro de este sistema se encuentra la lombriz de tierra *Eisenia foetida* la cual se ha generalizado su uso en procesos de vermiremediación. El objetivo de este trabajo fue estudiar y caracterizar la diversidad genética de bacterias endosimbióticas asociadas a *Eisenia foetida* usando técnicas microscópicas, tinciones diferenciales, herramientas moleculares y genómicas. Las endobacterias fueron aisladas del intestino de la lombriz de tierra y cultivadas en medios específicos Agar Nutritivo (AN), Agar Infusión Cerebro Corazón (ICC), Agar Rojo Congo (RC) y Agar Soya Trypticaseína (TSA). La característica de la célula bacteriana, así como la morfología de las colonias en los medios de cultivo selectivo fueron estudiadas. El estatus taxonómico de las cepas bacterianas fue estudiado usando el marcador molecular 16S rRNA y mediante huellas genómicas ERIC_PCR y RFLP. La identificación de las cepas fue realizada mediante análisis filogenético basado en el gen *rrs*. Se obtuvieron 74 cepas endobacterianas del intestino de *E. foetida*, de las cuales 24 cepas crecieron en medio AN, 21 en Agar Rojo Congo, 15 en ICC y 14 en Agar TSA. ERIC_PCR permitió obtener 16 patrones de huellas genómicas distintos y con RFLP se obtuvieron 7 patrones de restricción. De acuerdo al análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA se identificaron 4 géneros distintos, *Bacillus*, *Caryophanon/Solibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*.

La importancia de la biodiversidad bacteriana de *E. foetida* radica en las aplicaciones que puedan desarrollarse por medio de su actividad ya sea de manera mutualista o simbiótica con otros organismos, la diversidad bacteriana caracterizadas en este estudio tiene potencial en distintas aplicaciones como biorremediación, aplicaciones médicas, farmacológicas, cosméticas, alimentos etc., estudios adicionales se requieren para elucidar los factores que intervienen y el papel que juegan estas bacterias en estos procesos.

I. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es la variedad de la vida en la tierra, incluye todos los organismos, especies y poblaciones; la variación genética entre ellos, y el complejo ensamble de comunidades y ecosistemas. También se refiere a la interrelación de genes, especies, ecosistemas y a su vez las interacciones con el medio ambiente. (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012)

La biodiversidad que se encuentra en la tierra al día de hoy consiste en millones de distintas especies biológicas. La tierra, el aire, y los océanos de nuestro planeta son hogar de los más pequeños insectos y los animales más grandes, los cuales hacen un rico tapiz de fuerzas interconectadas e interdependientes, esto es biodiversidad. Se cree que la palabra biodiversidad se acuñó por primera vez en 1985 como una contracción del término “diversidad biológica” y se popularizó por un buen número de autores (Benn, 2010).

La biodiversidad genética son todos los diferentes genes contenidos en todas las especies vivas, incluyendo plantas, animales, microorganismos, etc.

Las bacterias son tipificadas por su tamaño, las cuales son usualmente del orden de 1 μm de diámetro, y la relativa simplicidad de su estructura, no contienen mitocondria o cloroplastos, su material genético no está contenido dentro de una membrana nuclear (Achtman & Wagner, 2008).

La notable habilidad de las bacterias para sobrevivir en ambientes extremos, su capacidad de simbiosis con otros seres vivos la disponibilidad de sistemas de análisis genéticos han atraído en tiempos recientes nuevos estudios que permitan comprender de mejor manera sus características.

Sin embargo, el estudio de los microorganismos, dado su pequeño tamaño y sus tasas generacionales muy variables (pero que pueden ser muy rápidas), implica una problemática natural. Actualmente, en general se acepta que se conoce tan sólo el 1% de la diversidad total de bacterias en el planeta, y que en un gramo de suelo existen 10 mil millones de células bacterianas, que pertenecen, al menos, a miles (según algunos autores millones) de especies (Bonilla-Rosso, Souza, & Eguiarte, 2008).

El suelo es un sistema complejo que alberga una gran cantidad y diversidad de microorganismos (Hernández-León, Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda, & Santoyo, 2010). Dentro de este sistema se encuentran las lombrices de tierra, las cuales se usan para distintos fines, tales como cebos de pesca y en procesos de vermiremediación, por su tolerancia a muchos contaminantes químicos incluyendo metales pesados y contaminantes orgánicos del suelo. En este procesos se utilizan varias especies de lombrices, de estas, la más conocida y usada es la lombriz *Eisenia foetida*, conocida también como lombriz roja o californiana (Villegas, 2013).

El intestino de esta especie de lombriz de tierra contiene una gran variedad de microorganismos, están situados en una parte esencial del intestino llamado el ciego y juegan un papel crítico en la descomposición de los alimentos dentro de la lombriz para que pueda absorber adecuadamente los nutrientes esenciales (Yard, 2007).

Estas lombrices pueden acelerar significativamente la descomposición de la materia orgánica, que se sabe que está mediada por la microflora intestinal asociada. Sin embargo, de acuerdo con Singh *et al.* (2015), existe escasa información sobre la abundancia y diversidad de la flora bacteriana intestinal en diferentes géneros de lombrices, particularmente *Eisenia foetida*; por lo cual se llevó a cabo un estudio que permitiera estimar la diversidad genética de bacterias asociadas al intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

En este trabajo se realizó la reproducción y desarrollo de las lombrices usando Peat-Moss como soporte y excreta de conejo como sustrato para posteriormente efectuar el aislamiento de cepas endobacterianas del intestino de *Eisenia foetida*, las cuales se caracterizaron fenotípicamente y posteriormente se identificaron y clasificaron taxonómicamente usando técnicas y herramientas de biología molecular.

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos biológicos de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

La lombriz de tierra *Eisenia foetida* tiene una forma rayada y presenta el área entre los segmentos sin pigmentación o de color amarillo por eso se le llama comúnmente lombriz roja o lombriz rayada. Mide de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 mm de diámetro y respira por medio de su piel (Bartlett, 2010). La segmentación en esta lombriz está compuesto por anillos en su cuerpo, el primer anillo o segmento es la cabeza y el último es el ano, estos segmentos proporcionan al gusano la capacidad de excavar de manera más eficiente de lo que lo haría sin tener estos segmentos. Se clasifican como hermafroditas, sin embargo no ha habido casos documentados de autofecundación. La reproducción típica ocurre cuando han alcanzado la edad reproductiva y se puede diferenciar fácilmente por la presencia de un “clitelo” desarrollado, el cual es una estructura especializada que es de vital importancia en su reproducción (Yard, 2007), viven aproximadamente unos 4.5 años y pueden llegar a producir, bajo ciertas condiciones, hasta 1300 lombrices al año (Bartlett, 2010).

La lombriz de tierra *E. foetida* obtiene sus nutrientes principalmente de la materia orgánica del suelo, a través del tiempo, la lombriz ha creado varias relaciones simbióticas dentro de su sistema digestivo con el fin de romper los alimentos de manera eficiente (Yard, 2007). Además de las relaciones simbióticas desarrolladas, también tiene varias estructuras internas importantes que ayudan en la digestión de los nutrientes.

El manejo y explotación exitosos de los recursos biológicos de la lombriz posee el potencial para entregar beneficios significativos tanto ambientales como económicos, especialmente a la luz de las preocupaciones globales con respecto al uso sustentable de la tierra, seguridad alimentaria y cambio climático.

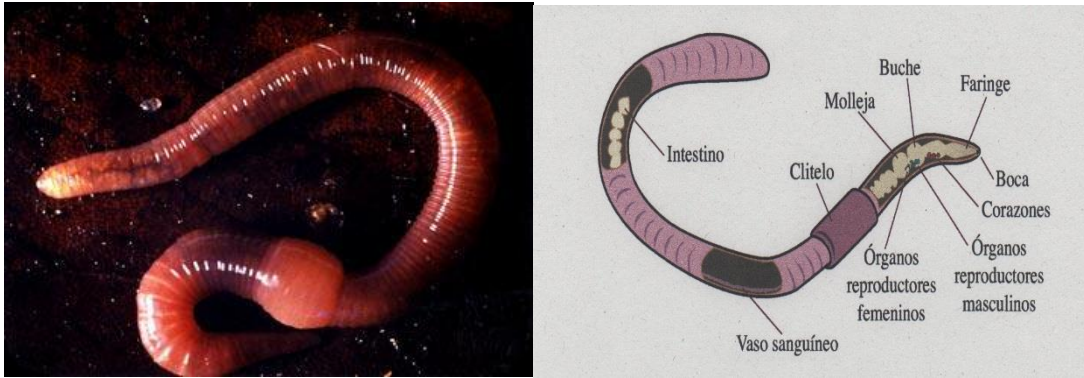


Figura 1. Lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Villegas, 2013).

2.1.1 Clasificación Taxonómica de la lombriz de tierra *Eisenia Foetida*

La importancia de la taxonomía está bien reconocida por la mayoría de los científicos y de hecho, sin una taxonomía fiable, la mayoría de los estudios ecológicos son irrelevantes. En muchas especies de lombrices de tierra la identificación taxonómica basada en caracteres morfológicos es difícil debido a la ausencia de diagnósticos de carácter estable y fácil de manejar (Domínguez & Pérez-Losada, 2010). La base de datos de UniProt (2002-2015) describe la clasificación taxonómica de *Eisenia foetida* como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Anelida</i>
Clase	<i>Clitellata</i>
Subclase	<i>Oligochaeta</i>
Orden	<i>Haplotaxida</i>
Suborden	<i>Lumbricina</i>
Familia	<i>Lumbricidae</i>
Subfamilia	<i>Lumbricinae</i>
Género	<i>Eisenia</i>
Especie	<i>foetida</i>

La identificación de lombrices adultas está basada principalmente en la posición y forma del clitelo, además de los órganos internos como las vesículas seminales y espermatecas.

2.1.2 Ecología de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

La mayoría de las lombrices de tierra, de las cuales existen más de 1,000 especies del Phylum Annelida (Reyes, López, & Aguirre, 2008) están adaptadas a un hábitat específico, sin embargo, se ha demostrado que ciertas especies se pueden reproducir fuera de estas condiciones naturales, ya que presentan una alta capacidad de adaptación y una gran velocidad de reproducción (Moreno-Reséndez & Cano-Ríos, 2005).

Los anélidos han colonizado los hábitats marinos, terrestres y de agua dulce. Más de aproximadamente 3,500 especies de las también llamadas “lombrices de tierra” (Oligochaeta) habitan en suelos, incluyendo suelos suspendidos, especialmente en climas húmedos tropicales (Montgomery, 2007) otros viven sumergidos en lodos residuales de cuerpos de agua dulce y lechos marinos, donde forman parte substancial de la fauna benéfica (Paoletti, 2005).

De acuerdo con Reynolds & Wetzel (2004), hay más de 8,300 especies en la subclase de las Oligochaeta de los cuales cerca de la mitad son lombrices de tierra; las más comunes se encuentran en Europa, Norteamérica, Asia occidental y muchas otras partes del mundo pertenecen a la familia Lumbricidae.

Las lombrices de tierra ocupan diferentes nichos ecológicos, y han sido clasificados basados en su alimentación y estrategias de excavación, en 3 categorías ecológicas: epigeas, anécicas y endogeicas (Masín, Rodríguez, & Maitre, 2011) las endogeicas y anécicas (excavadoras) viven en el suelo y consumen una mezcla de suelo y materia orgánica, en tanto que las especies epigeicas como *Eisenia foetida* son habitantes de la basura y los residuos orgánicos, también son transformadores de este último, viven en los horizontes de suelos orgánicos o en la superficie de los residuos, se alimentan principalmente de partículas gruesa de materia orgánica (Domínguez & Edwards, 2011), por lo que incluso debido a su habilidad de colonizar residuos orgánicos, tasas altas de consumo, digestión, y asimilación de materia orgánica;

y aunado a esto la tolerancia a un amplio rango de factores ambientales, ciclos de vida cortos, altas tasas de reproducción, resistencia y tolerancia a la manipulación (Domínguez & Pérez-Losada, 2010) se usa comúnmente para procesos de vermicompostaje, inclusive se ha dicho que *Eisenia foetida* es una especie Haemerobionte, lo cual significa que su hábitat y ubicación geográfica sería dependientes de la cultura humana (Yard, 2007).

2.1.3 Uso e importancia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

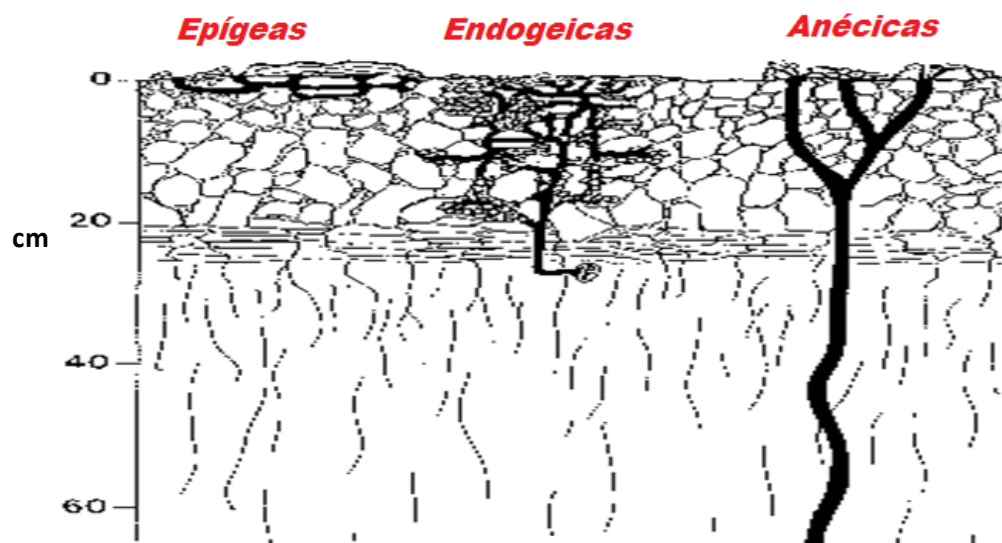


Figura 2. Clasificación de las lombrices de tierra en base a su hábitat y estrategias de excavación

Charles Darwin señaló que “la lombriz es el animal que desempeña el papel más importante dentro de las criaturas, porque cierra el circuito de la vida y la muerte” (De Sanzo & Ravera, 2000). La lombriz de tierra transforma los residuos orgánicos, convirtiéndolos en humus de óptima calidad, con el cual se promueve la actividad biótica y se incrementa el nivel de fertilidad del suelo (Moreno-Reséndez & Cano-Ríos, 2005).

Las lombrices de tierra continuamente son referidas como los ingenieros ecológicos, varían en su habilidad para utilizar el material ingerido como fuente de carbono y energía y su sistema digestivo mutualístico con lleva una eficiencia de asimilación que va desde 1 hasta 60% (Edwards, 2005), en un intervalo corto de tiempo, como el de la digestión de la lombriz se fraccionan los residuos

orgánicos y libera algunos nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) que pueden ser asimilados por las plantas (Lavelle, y otros, 2010).

Estas lombrices tienen una gran capacidad de adaptación al medio ambiente, muestran una alta resistencia a los contaminantes orgánicos. A través de sus secreciones mucilaginosas y la transformación de la materia orgánica del suelo pueden incrementar la actividad microbiana y disponer de los nutrientes de la materia orgánica (Zhong, y otros, 2012), también participa en la formación de suelo, regularización y suministro de agua por su actividad mecánica dentro del suelo, dada su capacidad de moverse, en la creación de estructuras que permiten la aireación del suelo y la infiltración del agua (Brito-Vega, 2010).

Hasta ahora, algunos estudios han informado de que las lombrices de tierra podían mejorar la remoción de contaminantes orgánicos. Eijsackers *et al.*, (2005), reportaron que las lombrices de tierra podrían reducir la cantidad total de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos. Singer *et al.*, (2008), encontraron que los suelos tratados con lombrices de tierra alcanzaron el 55% de bifenilos policlorados (PCB) eliminados, en comparación con 39% en suelos sin tratamiento con lombrices de tierra.

Luepromchai *et al.*, (2006), informaron que las lombrices de tierra podrían acelerar la eliminación de PCB mediante el aumento de la distribución microorganismos PCB-degradantes y la población de bacterias bifenilo-degradantes. Sin embargo, la evidencia es aún limitada para el efecto de mejora de las lombrices de tierra sobre la remediación de contaminantes orgánicos (Zhong, y otros, 2012).

Debido a estas características las lombrices de tierra *e.g.*, *Eisenia foetida* se utilizan en el proceso de vermicomposteo de muchos residuos orgánicos.

2.1.3.1 Vermicomposta

El vermicompostaje es el término dado al proceso de conversión de manera biodegradable por lombrices de tierra en Vermicomposta. Es la elaboración de abono orgánico a través de la utilización de varias especies de lombrices de las cuales la más conocida y usada es *Eisenia foetida* (Durán *et al.*, 2009).

La vermicomposta en términos generales posee, entre otras las siguientes características:

Material de color oscuro, su gran bioestabilidad evita su fermentación o putrefacción, contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos. Favorece e incrementa la actividad biótica del suelo. Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas en contra de plagas, enfermedades y organismos patógenos (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011). Los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene regeneran las características químicas del suelo y, al igual que ciertos tipos de hormonas de crecimiento, favorecen el desarrollo de las especies vegetales. Posee un pH neutro. Mejora las características estructurales del terreno, amortigua el efecto de los compuestos químicos aplicados al suelo (Domínguez & Edwards, 2011). Su elevada capacidad de intercambio catiónico se debe a la presencia de grupos carbonilos e hidroxilos fenólicos y alcohólicos, entre otros, en su estructura (Caliskan, 2012).

Mediante el uso de la lombricultura, es posible convertir casi cualquier tipo de desecho orgánico en un producto final denominado genéricamente como lombricompost el cual es utilizado en la agricultura (Durán & Henríquez, 2009). Según Bartlett (2010), los abonos orgánicos mejoran tanto las propiedades químicas del suelo, como las propiedades físicas y biológicas, contribuyendo igualmente a la solución del problema de la contaminación del ambiente.

La especie de lombriz utilizada debe presentar algunas características que la hagan apta para la producción de lombricompost, entre estas características se puede citar: La adaptación a un rango amplio de temperaturas (15-25°C), tasas de reproducción altas (Gómez-Brandón, Lores, & Domínguez, 2012) baja

tendencia a la migración (Villalobos & Boschini, 2009), no ser vector de enfermedades (Durán & Henríquez, 2009).

Domínguez y Edwards (2011), mencionan que *Eisenia foetida* cumple con estos requerimientos; sin embargo a pesar de la adaptabilidad que presentan las diferentes especies de lombriz, las características del sustrato o material de crecimiento, afectan directamente el estado y multiplicación de este organismo (Durán & Henríquez, 2009).

El primer paso en el vermicompostaje se produce cuando las lombrices rompen el sustrato hasta pequeños fragmentos antes de ingerirlo. Esto aumenta la disponibilidad de microorganismos y enzimas del sustrato. El sustrato es entonces ingerido y pasa por un proceso de digestión enzimática provocada por numerosas especies de bacterias y enzimas presentes en el intestino de la lombriz, finalmente la lombriz excreta vermicomposta (Villegas, 2013).

Este producto final es obtenido conforme los residuos orgánicos pasan a través del intestino de la lombriz y es bastante diferente al material original (Atiyeh, Lee, Edwards, Arancon, & Metzger, 2005). Además se ha demostrado que bajo la acción de las lombrices se incrementa tanto la velocidad de mineralización del N como los índices de conversión del $N-NH_4^+$ a $N-NO_3$ (Moreno-Reséndez A. , 2005). Mientras los microorganismos son responsables de la degradación bioquímica de la materia orgánica en el proceso de vermicomposteo, las lombrices son importantes para acondicionar el sustrato y para promover la actividad microbiana (Behr, y otros, 2010). Las lombrices actúan como batidoras mecánicas ya que estas desintegran el material orgánico, incrementan el área superficial expuesta a los microorganismos y mueven los fragmentos y los excrementos ricos en bacterias, en consecuencia, homogenizan el material orgánico (Domínguez & Edwards, 2011). Adicionalmente, la actividad de las lombrices en el proceso de vermicomposteo es tanto física/mecánica y bioquímica. Los procesos mecánicos incluyen: aireación del sustrato, mezclado y molienda. El proceso bioquímico es afectado por la descomposición microbiana del sustrato en el intestino de las lombrices (Buck, Bossuyt, Six, & Hendrix, 2005). El vermicomposteo también provoca la bioconversión de los

desechos en dos productos de utilidad: la biomasa de la lombriz y la Vermicomposta (Domínguez *et al.*, 2001).

Moreno-Reséndez (2005), menciona que las interacciones complejas entre residuos orgánicos, microorganismos, lombrices y otros animales de la fauna del suelo provocan la biooxidación y estabilización de dichos residuos. Una gran variedad de microorganismos y organismos invertebrados del suelo proliferan e interactúan contribuyendo al “ciclo de la materia” dentro del vermicomposteo. El sistema de vermicomposteo soporta complejas cadenas alimenticias, y al mismo tiempo, modifica diferentes formas químicas de diversos elementos nutritivos contenidos en los compuestos orgánicos, los cuales son importantes para la dinámica de los elementos nutritivos.

Por todo lo mencionado anteriormente, el empleo de las lombrices de tierra en la descomposición de una amplia gama de residuos orgánicos, incluyendo lodos de aguas negras, desechos de animales, residuos de cultivos, y residuos industriales, para generar vermicomposta se ha incrementado de manera considerable (Atiyeh *et al.*, 2002).

2.2 Microorganismos asociados a la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

Las interacciones entre *Eisenia foetida* y las comunidades microbianas se pueden examinar en tres escalas. Como microfauna (intestino de la lombriz, revestimiento de las galerías, o heces) las preferencias de alimentación de la lombriz, el destino de los microorganismos en el intestino de la lombriz, la composición química y biológica de las deyecciones y el sucesivo proceso. Como mesofauna, la cual está integrada por la drilosfera (zona del suelo influenciada por las lombrices) y el suelo circundante, se toma en cuenta la forma en el que la actividad de las lombrices influye sobre las características y funciones del suelo, así como la distribución de los microorganismos, la respiración del suelo, biomasa microbiana, proporciones bacterias-hongos. Y como macrofauna (*e.g.*, la de un campo) pocos datos están disponibles, pero los estudios indican que las lombrices de tierra inducen cambios sobre las funciones microbianas, y tienen el potencial de influenciar en una escala más amplia los procesos tales como la estructura del suelo (afectando la filtración de agua y la

erosión), diversidad microbiana, productividad del suelo y rendimiento de los cultivos (Domínguez & Edwards, 2011).

El suelo, el mayor reservorio de microorganismos, reúne los requerimientos alimenticios de las lombrices y por esto es necesario establecer los diferentes tipos de relaciones entre las lombrices y los microorganismos, como son; microorganismos que forman parte de la dieta de las lombrices, los que proliferan en el intestino de las lombrices y vermicomposteo, lombrices que regulan la distribución de microorganismos y en simbiosis mineralizan, humifican la materia orgánica y facilitan la quelación de algunos iones metálicos (Parthasarathi, Ranganathan, Anandi, & Zeyer, 2007)

Debido a estas interacciones, Edwards (2005), afirma que la comunidad microbiana relacionada con *Eisenia foetida* tiene la capacidad de afectar la distribución y abundancia de las comunidades de lombrices de tierra.

2.2.1 Hongos

Muchas de las relaciones entre lombrices de tierra y hongos, tienen que ver con la alimentación de las lombrices. Estos forman un inevitable constituyente de la dieta natural de las lombrices (Edward *et al.*, 2005). Algunos microorganismos son preferencialmente ingeridos mientras otros son rechazados.

Estudios previos han destacado las selectivas estrategias de alimentación en varias especies de lombrices para con ciertas especies de hongos y bacterias (Neilson *et al.*, 2005).

En múltiples pruebas de selección *L. terrestris*, prefirió hojas de manzana y discos de papel inoculados con microorganismos y mostró una clara preferencia sobre dos hongos de suelo, *Mucorhiemalis* and *Penicillium* sp. en lugar de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, indicando que el crecimiento de hongos en alimentos como sustratos pueden incrementar la disponibilidad de carbohidratos y componentes nitrogenados para las lombrices (Wright, 2010). Bonkowsky (2000) estudió las preferencias de algunas especies de lombrices para una variedad de hongos de suelo. Nueve especies de hongos fueron propuestas para 5 especies diferentes de lombrices, encontraron que dos especies de hongos, *Fusarium nivaley* *Cladosporium cladosporioides* de Vries, fueron

preferidas por las lombrices. Se concluyó entonces que las lombrices usaban la sucesión primaria con los hongos para detectar fuentes de materia orgánica fresca en el suelo, pero la naturaleza en sí de sus preferencias es desconocida (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012).

En otros estudios Savigny mostró que las lombrices de tierra prefieren materia orgánica inoculada con diferentes especies de actinomicetos en comparación con un control (materia orgánica sin actinomicetos) (Jayasinghe *et al.*, 2009). Esta es el primer ejemplo de la preferencia alimenticia de las lombrices sobre los actinomicetos. La forma de alimentación y la selección de sus recursos alimenticios son temas aún no resueltos (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012).

La evidencia de la presencia de quimiorreceptores en lombrices (Zirbes, *et al.*, 2012) combinado con su habilidad de seleccionar materia orgánica específica, ha llevado a la hipótesis de que la olfacción puede ser usada por las lombrices en su búsqueda de nutrientes adecuados, incluyendo microorganismos. Ciertamente, muchos organismos vivos han desarrollado modalidades sensoriales basadas en principios de organización neural para detectar y reaccionar a los químicos presentes en el ambiente externo.

Otra de las relaciones que se presentan entre las lombrices especialmente las que se usan en vermicomposteo como *Eisenia foetida* es que afectan en gran manera la comunidad de hongos mediante la selección de estos mismo como se había mencionado anteriormente e influyen en la germinación de esporas creando micrositios favorables o desfavorables para el desarrollo de hongos (Tiunov & Scheu, 2004). Hay pocos estudios sobre estos mecanismos que han provisto de datos en parte contradictorios y destacan la importancia de monitorear los aspectos higiénicos de estos procesos mesofílicos en las comunidades Fungi.

Por otro lado en los procesos de vermicomposta se ha encontrado que la abundancia tanto de hongos como de bacterias se ve drásticamente disminuida por la acción de *Eisenia foetida* después de un mes de actividad. Las lombrices pueden reducir la biomasa microbiana directamente mediante consumo selectivo de bacterias y hongos (Zirbes *et al.*, 2012) o indirectamente acelerando drásticamente la reducción de recursos para los microbios.

2.2.2 Levaduras

Las formas de interacción entre invertebrados y levaduras son muy diversas. Pueden estar envueltas en interacciones simbióticas con los invertebrados y participar en su nutrición. La asociación de levaduras con xilófagos, o agregados de levaduras endosimbióticas en el intestino de diplópodos y otros saprófagos, son algunos de los ejemplos. La descomposición parcial de material orgánico por invertebrados (lombriz de tierra *Eisenia foetida*) resulta además de otros productos en la formación de sustratos favorables para el desarrollo de las levaduras (Yurkov, Chernov, & Tiunov, 2008).

En el tiempo actual, las investigaciones se han conducido principalmente en dos direcciones, expandir la lista de los invertebrados asociados a las levaduras, e identificar estas especies de levaduras (Byzov, Thanh, & Babveja, 2009).

Las lombrices de tierra están entre estos animales que interactúan con las levaduras y su vital que juega un papel importante en la formación de comunidades microbianas del suelo, la basura y materia orgánica predominan como forma de alimentación en *Eisenia foetida*. Las lombrices también consumen selectivamente las levaduras que se encuentran en la superficie del suelo; pasando a través de su tracto digestivo, éstas pueden ser digeridas, inactivadas, o excretadas, por lo tanto vuelven al suelo. Las lombrices también toman parte en la formación de la comunidad de levaduras del suelo (Edwards & Fletcher, 2004).

Entre las levaduras que predominan en el intestino de las lombrices, se encuentran particularmente especies del género *Pichia*, *Zygowilliopsis*, *Debaromyces* y *Torulaspota* (Byzov, Thanh, & Babveja, 2009).

A pesar de la continua lista creciente de especies de levaduras descubiertas, muy poco es conocido acerca de la función que desempeñan en conjunto con los invertebrados, el principal criterio que se ha usado para clasificar las levaduras como simbioses es lo que ocurre con mayor frecuencia en el intestino y excremento de las lombrices. Sin embargo, esto no es criterio suficiente para una simbiosis. Detalles más específicos son requeridos de esta asociación microbiana como por ejemplo resistencia y estabilidad del simbiote bajo

diferentes condiciones y el beneficio para el anfitrión. Aun así las interacciones entre lombrices de tierra y bacterias, actinomicetos, y hongos miceliales han sido estudiadas muy activamente durante los últimos 15 años (Yurkov, Chernov, & Tiunov, 2008).

2.2.3 Bacterias endosimbiontes

Varios estudios clásicos ilustran que el microhábitat del intestino de la lombriz posee una equivalente carga microbiana comparada con el suelo, haciendo un microbioma metabólicamente activo. En las últimas décadas, los avances en técnicas de microscopía electrónica de barrido y microscopía de epifluorescencia han llevado en gran parte hacia el desciframiento de la comunidad microbiana del intestino de la lombriz, de una manera más efectiva. 16S rDNA basada en reconocimientos clonales de DNA del intestino de lombriz, Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) e Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) usando sondas de oligonucleótidos específicas, están entre las modernas herramientas usadas para estudiar la diversidad bacteriana en el intestino de la lombriz (Singh, y otros, 2015). La microscopía fluorescente ha sido usada para estudiar variaciones de la población bacteriana dentro de cada segmento intestinal de las Oligochaetas.

El uso de técnicas moleculares ha puesto de manifiesto el relativo desconocimiento de la diversidad biológica, una clasificación sistémica y la taxonomía dado que los microorganismos no son cultivables en medios convencionales, y también el análisis de genes funcionales, son clave en importantes procesos del suelo, tales como la desnitrificación, nitrificación, fijación del nitrógeno y oxidación del metano (Nogales, Cifuentes, & Benítez, 2005). El estudio de la diversidad de microorganismos se basa actualmente en análisis de proteínas, DNA o RNA de genes ribosomales 16S o 23S y la presencia de enzimas o enzimas de restricción (Curry & Schmidt, 2007).

Estos análisis han documentado que los representantes de Ácidobacteria, Firmicutes, β -Proteobacteria, y un grupo no clasificado de bacterias están estrechamente asociados con el intestino de las lombrices de tierra (Singleton, Furlong, Coleman, & Whitman, 2008). La presencia de *Acidovorax* como simbionte en los nefridios de *L. terrestris*, *Aporrectodea tuberculata*, y *Eisenia*

foetida fue descubierto usando hibridación fluorescente in situ (FISH) usando sondas de oligonucleótidos específicas (Schram & Meglistch, 2003).

Los nefridios son órganos osmoregulatorios-excretorios presentes en cada segmento del cuerpo de la lombriz, de acuerdo con los descubrimientos de Schram *et al.*, (2003) se encontró que esas bacterias pueden ser proteolíticamente activas durante la excreción, facilitando la absorción de péptidos y aminoácidos por el anfitrión. Hasta qué punto esta asociación influye sobre la excreción de nitrógeno por las lombrices, es la consecuencia de que el ciclo del nitrógeno en el suelo es aún desconocido (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012).

Desde que se descubrió la simbiosis en los nefridios de *Eisenia foetida*, varios estudios con respecto a la colonización bacteriana de los nefridios de las lombrices han sido reportados (Davidson *et al.*, 2006; Pinel *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2010). Primeramente, Davidson (2006) demostró que los simbiosis en los nefridios son directamente transferidos de los adultos a las cápsulas durante el apareamiento, y no son adquiridos del medio ambiente en *Eisenia foetida*.

Un estudio reciente hecho por Thakuria *et al.* (2010) concluyó que la selección de bacterias asociadas con la pared intestinal de especies anécicas y endogeicas fue un proceso de selección natural, con las principales determinantes de ser un grupo ecológico, seguido del hábitat y especies.

Las lombrices epigeas poseen un grupo diverso de enzimas digestivas, las cuales les permite digerir bacterias, protozoos, hongos y en parte restos vegetales descompuestos. Reportes recientes sugieren que la digestión de material orgánico por estas especies de lombrices tiene efectos negativos sobre la biomasa microbiana (Gómez-Brandón, Lores, & Domínguez, 2012).

Ciertamente, la supervivencia de los microorganismos en el intestino de la lombriz depende de su capacidad para resistir las enzimas digestivas microbianas, mucosa intestinal, CaCO₃, o sustancias bacteriostáticas y microbianas (Zirbes, Thonart, & Haubruge, 2012). La presencia de un sistema digestivo mutualístico se demostró en varias especies de lombrices de tierra tropical y templada, en la que el carbono orgánico soluble, en forma de una

mezcla de mucosa de bajo peso molecular, se añadió para mejorar la proliferación de la microflora del suelo (Lavelle *et al.*, 2010). Sin embargo una comprensiva descripción del sistema digestivo y el origen de diferentes enzimas del intestino de la lombriz requieren investigaciones adicionales (Brown, Benito, Pasini, Sautter, & Torres, 2006).

En los estudios sobre bacterias dentro del intestino de la lombriz, diversos métodos y técnicas han sido usados los cuales han ayudado a identificar especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Enterobacter* (Byzov *et al.*, 2007; Singleton, *et al.*, 2003). Estas bacterias son principalmente promotores de crecimiento de plantas fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadores de fosfatos (Martínez-Romero, 2001). Algunos investigadores también señalan la existencia de un posible tipo de mutualismo entre estos dos organismos (Brown *et al.*, 2006).

Byzov *et al.*, (2009) reportó en un estudio evidencia de simbiosis en el intestino de la lombriz de tierra. Encontraron algunos microorganismos en el intestino de la lombriz que estaban ausentes en el suelo circundante. Aun así la presencia de todas las bacterias en el intestino de la lombriz y en el suelo, no permite determinar si las comunidades bacterianas comparten una simbiótica o mutualística interacción metabólica con las lombrices de tierra (Thakuria *et al.*, 2010). Jolly *et al.*, (2008) demostró la existencia de contacto físico entre algunos filamentos, segmentos de bacteria y la mucosa intestinal de las especies *Octolasion lacteum* y *Lumbricus terrestris*. Los resultados mostraron que los filamentos bacterianos se habían unido a la pared intestinal de la lombriz por medio de estructuras de gancho. Por lo tanto, se concluyó que la bacteria puede adaptarse dentro del intestino de la lombriz.

El proceso de identificación de bacterias asociadas al intestino de la lombriz se dificulta, si estos microorganismos requieren condiciones de crecimiento presentes solo en el intestino de las lombrices (Singleton *et al.*, 2003). En consecuencia, diversos estudios principalmente sobre las interacciones de bacterias dentro del intestino de las lombrices de tierra se han llevado a cabo (Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009).

A pesar de los recientes estudios, la existencia real de simbiosis en el intestino de la lombriz, es aún controversial (Curry *et al.*, 2007). Estudios adicionales con una gran diversidad de especies de lombrices son necesarios para confirmar la presencia real de simbiosis en el intestino de la lombriz y el rol que desempeñan.

Aunado a esto, comprensivos estudios con respecto a la diversidad funcional de la flora bacteriana en el intestino de la lombriz, aún están en su infancia, especialmente en relación a la diversidad bacteriana no cultivable de la lombriz común. *E. foetida* juega un rol importante en la sustentabilidad de la fertilidad del suelo y la descomposición de la materia orgánica, y escasa información está disponible en la naturaleza y especificidad del microbioma nativo (no cultivables) en diferentes géneros de lombrices vis a vis, la flora microbiana transitoria/alimento que se mueve a través del intestino y su influencia en la diversidad funcional del metagenoma (Singh, y otros, 2015).

En relación a este hecho, los microorganismos forman un componente esencial de la dieta de *Eisenia foetida*, como se ha venido mencionando en este capítulo, y tiene una relativamente alta absorción intestinal de patógenos vivos del suelo. El medio digestivo de la lombriz es selectivo para hongos y bacterias los cuales entran al intestino junto con los alimentos. Byzov *et al.*, (2007), presentó la evidencia de que el fluido del intestino medio de la lombriz posee una sorprendente actividad selectiva contra los microorganismos del suelo. La comunidad presente de actinomicetos en el intestino de *Eisenia foetida*, principalmente *Streptomyces caeruleus*, se desarrolló mejor en el intestino en comparación al suelo, y ayudó a la lombriz a metabolizar la materia orgánica y descomposición de sustancias provenientes de las plantas (Polyanskaya, Tiunov, & Dobrovolskaya, 2010).

Por estos contrastantes efectos en poblaciones de bacterias y hongos por la actividad de las lombrices, se espera que tengan importantes implicaciones sobre las rutas de descomposición, porque existen diferencias importantes en la forma de degradar compuestos entre hongos y bacterias relacionadas con las necesidades de alimentación y el aprovechamiento de las mismas. Esto está basado en el hecho de que los hongos pueden inmovilizar grandes cantidades de nutrientes en sus hifas, mientras que las bacterias tienen un mayor

aprovechamiento de los nutrientes mediante la estrategia de usar rápidamente nuevos sustratos lábiles producidos (Gómez-Brandón, Lores, & Domínguez, 2012).

Una observación fue hecha para la especie *Eisenia foetida* viniendo de suelo contaminado en una zona industrial. Hubo un incremento de 91 colonias, y luego se dividieron en dentro de 12 grupos: *Aeromonas* 6%, *Agromyces* 3%, *Bacillus* 31%, *Bosea* 1%, *Gordonia* 6%, *Klebsiella* 6%, *Microbacterium* 7%, *Nocardia* 2%, *Pseudomonas* 10%, *Rodhococcus* 19%, *Tsukamurella* y *Streptomyces* 7%. El género *Bacillus* fue el grupo dominante encontrado en el intestino de *Eisenia foetida* (Hyun-Jung, Kwang-Hee, Chang-Jun, & Hor-Gil, 2005).

Nueva evidencia revela un mayor sistema simbiótico y complejo en *Eisenia foetida* que involucran a 3 simbioses bacterianas de diferentes clases: *V. eiseniae*, una Microbacteriaceae y una flexibacteriaceae. La presencia de esas 3 bacterias en las cápsulas y en lombrices adultas confirmó que son simbioses asociados de *Eisenia foetida* y transmitidos a la siguiente generación (Davidson *et al.*, 2010).

La interacción con los microorganismos ingeridos del suelo y que transitan a través del intestino es una de las más interesantes cuestiones y debería ser profundamente analizada (Fiolka, Zagaja, Piersiak, Wróbel, & Pawelec, 2010).

Entre las interacciones que pueden relacionarse con las Oligochaetas, específicamente *Eisenia foetida* están las que ejercen sobre las micobacterias. Las micobacterias consisten en un diverso grupo de organismos representantes de bacterias saprófitas, es bien conocida su importancia como patógeno, (e.g. *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de la tuberculosis). Algunas micobacterias han sido aisladas de una pequeña proporción de lombrices de tierra en muestras de campo. Investigaciones muestran que las micobacterias fueron recuperadas de las lombrices solo poco tiempo después de la ingestión de las heces (Behr, y otros, 2010).

La habilidad de las lombrices para reducir la cantidad de micobacterias en su tracto digestivo ha motivado a los investigadores para buscar actividad

antimicrobiana en el intestino de estos invertebrados (Fiolka, Zagaja, Piersiak, Wróbel, & Pawelec, 2010).

Otra muestra de las relaciones simbióticas que existen entre *Eisenia foetida* y los microorganismos es en su crecimiento. Por ejemplo Miles (2008) observó que lombrices del género *Eisenia foetida* salieron de capullos microbiológicamente estériles y no pudo alcanzar la madurez sexual en suelo esterilizado hasta que cultivos mixtos de protozoos móviles fueron agregados a su dieta, las células de *Acidovorax*, presentes en los nefridios son dominantes en el mucus del apareamiento y en las cápsulas. La Filogenia obtenida por secuenciamiento de genes, basados en una comparación de 16S rRNA, reveló que todos los simbiosomas de lombrices formaban un grupo cohesivo e independiente (Pinel, y otros, 2012).

La caracterización genética de bacterias aisladas nos permite ampliar nuestro conocimiento sobre la diversidad bacteriana dentro de las diferentes estructuras o partes del tracto digestivo y bajo diferentes ecosistemas naturales presentando actividades antropogénicas.

2.3 Estudio de la biodiversidad genética de bacterias endosimbióticas

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer sus bases genéticas, es decir cómo está organizada la información genética, como realizan y regulan su expresión y que mecanismos de variación génica poseen.

El estudio de la diversidad genética se realiza para clasificar un individuo o población comparada con individuos u otras poblaciones, esta determinación puede basarse en información de tipo bioquímica, morfológica y molecular. Sin embargo, los marcadores moleculares han tomado ventaja sobre los otros tipos, en donde se muestran las diferencias genéticas en un nivel más detallado y sin interferencias de factores ambientales, en donde se involucran técnicas que proveen resultados rápidos detallando la diversidad genética. (Binneck, Bot, & Monard, 2010). Por otro lado el descubrimiento de plataformas de alto

rendimiento incrementa el número de datos por corrida y reducen el costo de datos incrementando la resolución del mapa (Caliskan, 2012).

2.3.1 Amplificación de genes cromosomales

Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de estructuras y composición de las especies de las comunidades microbianas. En particular, variaciones en las secuencias de rRNA han sido aprovechadas para inferir en las relaciones filogenéticas entre microorganismos, y para designar sondas de nucleótidos específicos para la detección de taxones individuales microbianos en hábitats naturales. Estas técnicas también han sido utilizadas para determinar la actividad la diversidad genética de comunidades microbianas e identificar varios microorganismos no cultivables (Fierer, Jackson, Vilgalys, & Jackson, 2005).

La ausencia de concordancia entre las características observadas, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la (s) cepa (s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011). Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica (no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros) se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos.

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan en base al ARNr 16S (Tanner, Maiden, Paster, & Dewhirst, 2007). El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomías bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue

propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Rodicio & Mendoza, Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica, 2004). El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla. El ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. Los ARNr 16S pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, siguiendo esta técnica, el ARNr 16S marcado *in vivo*, y purificado, se trata con la enzima ribonucleasa T1. Los fragmentos generados se separan, determinándose posteriormente la secuencia de todos aquellos que incluyan al menos 6 nucleótidos (nt). A continuación, las secuencias de la colección de fragmentos correspondientes a diferentes bacterias se alinean y comparan, utilizando programas informáticos, para calcular finalmente los coeficientes de asociación. La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S ha sustituido en la actualidad a la secuenciación de catálogos de oligonucleótidos (Sleigh, 2006).

Existen también conjuntos de marcadores moleculares para detectar polimorfismos del ADN, en los estudios de biodiversidad genética, los más utilizados son los microsatélites.

Los microsatélites o SSR (Repeticiones de Secuencia Única) o STR (Repeticiones Simples en Tándem) consisten en un tramo de ADN de unos cuantos nucleótidos de longitud de 2 a 6 pares de bases (bp) que se repiten varias veces en tándem. Están diseminados por todo el genoma de los eucariotas. Los microsatélites son de un tamaño relativamente pequeño y, por consiguiente, pueden ser fácilmente amplificados con la PCR usando ADN extraído de fuentes diversas, como la sangre, el pelo, la piel, e incluso las heces. Los polimorfismos se pueden visualizar en un gel secuenciador, y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis ultrarrápido de un gran número de muestras (Goldstein y Schlötterer, 2009).

- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16s (1500 nt.) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

El análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio & Mendoza, 2004).

La amplificación por PCR de DNAr 16S de organismos que aún son no cultivables, ha proporcionado una valiosa información sobre nuestra comprensión acerca de la estructura de sus comunidades, especialmente de las comunidades que habitan en ambientes extremos, donde las condiciones de crecimiento pueden ser difíciles de imitar en el laboratorio (Baker, Smith, & Cowan, 2008).

2.3.2 Huellas genómicas

Una técnica de tipificación basada en DNA, la cual es frecuentemente empleada para tales propósitos, depende de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y “primers” dirigidos a secuencias de nucleótidos específicas designadas como secuencias ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) para generar huellas genómicas específicas de cada cepa (Niemann, Carnwath, Schwarz, & Terletski, 2005).

ERIC-PCR se refiere al método general el cual utiliza primers de oligonucleótidos que emparejan secuencias repetidas palindrómicas descritas en las enterobacterias para producir huellas genómicas de aislados bacterianos individuales. Esta técnica ha probado ser útil en tipificar bacterias distintas de las enterobacterias como *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* (Diab & Al-Turk, 2011).

Las secuencias ERIC, también descritas como unidades intergénicas repetitivas, difieren de la mayoría de las otras repeticiones bacterianas, al ser distribuidas a

través de una amplia gama de especies. Estas secuencias han sido descubiertos en regiones intergénicas no codificadas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Shuhaimi, Ali, & Saleh, 2005). La secuencia ERIC es un palíndromo imperfecto. Además, secuencias más cortas son producidas por supresiones internas (Sharp & Wilson, 2006), como también secuencias más largas debido a inserciones de alrededor 70 pb en sitios específicos internos (Sharp, 2006). Las secuencias ERIC han sido encontradas solo en regiones intergénicas, aparentemente sólo dentro de regiones transcritas (Diab *et al.*, 2011).

El número de copias de la secuencia ERIC varía entre especies: se han estimado por extrapolación alrededor de 30 copias en *E. coli* K-12 y quizás 150 en *S. entérica Typhimurium* LT2 (Tanner *et al.*, 2007), mientras que la secuencia del genoma de *Photorhabdus luminescens* ha sido reportada conteniendo alrededor de 700 copias (Wilson & Sharp, 2006).

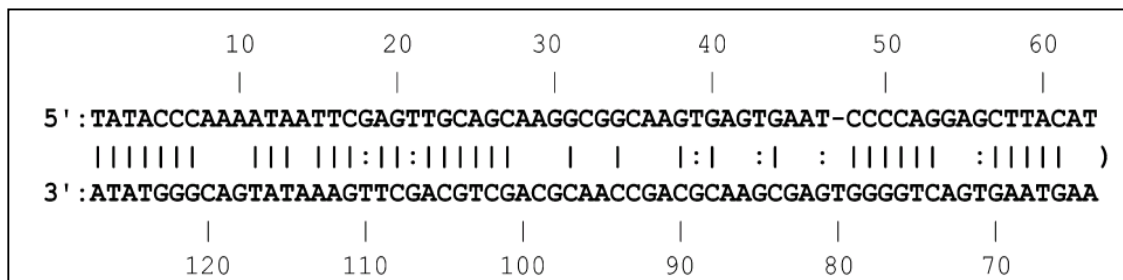


Figura 4. Secuencia ERIC. La secuencia de 127 pb se muestra como una horquilla. Líneas (y puntos) conectan las bases en los dos brazos complementarios en el DNA (y en el RNA). (Wilson & Sharp, 2006)

2.3.3 Secuenciamiento genético

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular, los plásmidos, la mitocondria y cloroplastos (en plantas) que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. De tal manera que, determinar la secuencia de ADN, es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así

como en campos aplicados. El desarrollo de la secuenciación de ADN ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología.

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del 16S ARNr y otras mencionadas arriba permiten llevar a cabo la secuenciación a gran velocidad, los cuales son de gran importancia para proyectos a gran escala, el medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero sí serán factores críticos la extracción del ADN cromosómico y la amplificación, procesos técnicos que deberán tenerse en cuenta en toda metodología de identificación molecular. Tras la secuenciación del amplicón, la observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias.

Actualmente la base de datos que presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes, y tipo y número de secuencias depositadas es la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias. Además GenBank contiene una sección de taxonomía que incluye información y secuencias sobre más de 160,000 organismos (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011).

2.3.4 Análisis Filogenético

La filogenia (del griego phylon: “tribu, raza” y genea: nacimiento, origen, procedencia”) es la determinación de la historia evolutiva de los organismos. La diversidad genética provee la fuente de materia prima para que la selección natural actúe (Blair & Murphy, 2011). La filogenética es el estudio de la filogenia utilizando diagramas tipo árbol para representar los ancestros de esos organismos, haciendo esto a diferentes niveles taxonómicos, incluyendo el árbol universal, formando una reconstrucción de esta relación en base a diversos caracteres homólogos (adquiridos por descendencia directa) tanto morfológicos como moleculares. Las hipótesis filogenéticas resultantes son la base para hacer predicciones (inferencias) sobre propiedades biológicas de los grupos revelados por la filogenia mediante el mapeo de caracteres sobre la topología (hipótesis evolutiva) (Harrison & Langdale, 2006).

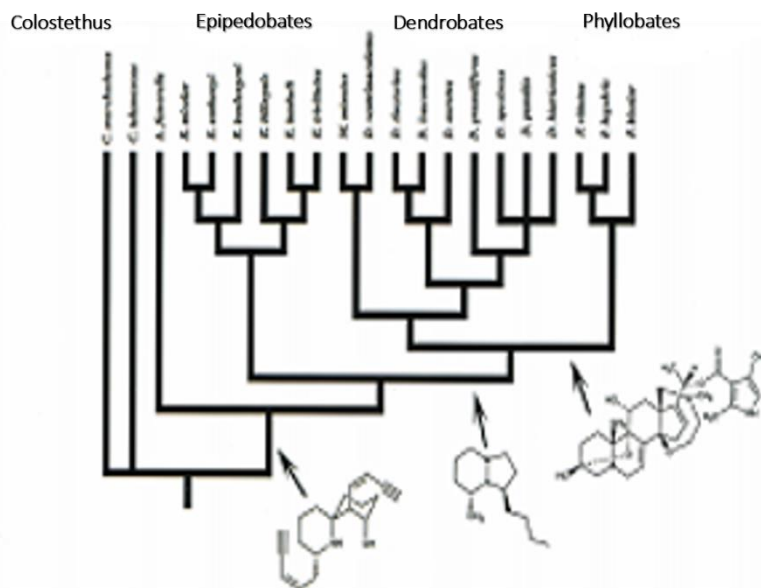


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre 21 especies (Dendrobatidae) utilizando secuencias de ADN. (Tello, 2013)

La evolución molecular estudia los mecanismos y procesos que han llevado a la formación de dichos caracteres, desde nivel de posiciones de un codón hasta la organización y estructura genómica y anatómica de un organismo, en un marco de biología comparada en contextos tanto de poblaciones (especies) como de linajes (supraespecífico). Para ello requiere de la hipótesis evolutiva de relaciones entre entidades revelada por una filogenia (Blair & Murphy, 2011).

Los caracteres moleculares que están en la forma de secuencias de ADN o de proteínas pueden ser muy útiles para proporcionar una perspectiva de la evolución de los organismos. Esto se debe a que en cuanto a la medida en que los organismos evolucionan, el material genético (genotipo) acumula las mutaciones que causan los cambios fenotípicos (expresión del genotipo, rasgos físicos y conductuales) (Vinuesa, 2007).

Gracias a la cantidad masiva de secuencias disponibles en las bases de datos (incluyendo decenas de genomas completos) y la disponibilidad de sofisticados modelos de evolución de secuencias y de su implementación en programas de

cómputo muy eficientes, las filogenias moleculares se han vuelto indispensables para examinar todo tipo de cuestiones evolutivas.

La filogenética estudia las mutaciones en las secuencias biológicas (ADN, ARN o proteínas) de una población de individuos con la finalidad de reconstruir su historia evolutiva usando árboles.

Para utilizar los datos moleculares para reconstruir la historia de la evolución se requiere hacer una serie de suposiciones:

- Las secuencias moleculares utilizadas en la construcción filogenética son homólogas, *i.e.*, comparten un origen común y posteriormente divergen al paso del tiempo.
- La divergencia filogenética se bifurca, *i.e.*, una rama padre se divide en dos ramas hijas en cualquier punto dado.
- Cada posición en una secuencia evoluciona de manera independiente.
- La variabilidad entre secuencias es lo suficientemente informativa para construir árboles filogenéticos precisos (Harrison & Langdale, 2006).

Un árbol filogenético es una estructura matemática usada para representar la historia evolutiva (relaciones de ancestro-descendiente) entre un grupo de secuencias u organismos. Dicho patrón de relaciones históricas es la estima hecha de la filogenia o árbol evolutivo (Tello, 2013). El procedimiento para construir árboles filogenéticos se divide en 5 pasos: elección de los marcadores moleculares, Alineamiento múltiple de secuencias, elección de un modelo de evolución, determinación de un método de construcción de árboles y verificación de la fiabilidad del árbol construido (Harrison & Langdale, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

El suelo es un sistema complejo y heterogéneo que alberga una gran cantidad y diversidad de microorganismos y dentro de este sistema se encuentran las lombrices de tierra los cuales se ha generalizado su uso en procesos de vermiremediación, especialmente *Eisenia foetida* o lombriz roja o californiana como se le conoce comúnmente.

Estas lombrices pueden acelerar significativamente la descomposición de la materia orgánica, la cual se sabe que esta mediada por la microflora bacteriana intestinal asociada. Hay evidencia de un sistema simbiótico entre bacterias y el intestino de la lombriz *Eisenia foetida*, sin embargo hay escasa información sobre la diversidad genética de endobacterias asociadas al intestino de *Eisenia foetida*, por lo cual surge la necesidad de estudiar dicha diversidad bacteriana.

El uso de herramientas moleculares y la caracterización genética son de suma importancia para ampliar el conocimiento de la diversidad bacteriana asociada al intestino de *Eisenia foetida*, esto ayudaría a comprender en estudios posteriores la relación simbiótica o mutualística que presentan estos microorganismos.

El conocimiento de la diversidad de los endosimbiontes de la lombriz *E. foetida* permitirá seleccionar algunas especies de microorganismos con potencial para su empleo en programas de biorremediación de sustancias tóxicas o xenobióticas que contaminan el ambiente y ecosistemas naturales.

Actualmente, el uso de microorganismos en programa de biorremediación ha cobrado importancia, considerando su eficiencia, fácil empleo y compatibilidad con el medio ambiente.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar la diversidad genética de bacterias endosimbióticas asociadas a la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Aislar endobacterias asociadas al intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* usando medios de cultivo específicos.
2. Caracterizar fenotípicamente las cepas endobacterianas asociadas al intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* usando técnicas de tinción específicas y estudio microscópico.
3. Identificar y clasificar taxonómicamente las cepas bacterias aisladas usando análisis filogenético basado en el gen cromosomal 16S rDNA, así como huellas genómicas y Secuenciamiento genómico.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo y reproducción de la lombriz de suelo *Eisenia foetida*.

Las lombrices de suelo *Eisenia foetida* utilizadas para el desarrollo de este proyecto fueron adaptadas y desarrolladas en cunas de crianza verticales, conformadas por cajones de 30 x 80 x 40cm (Fig. 6). Las unidades experimentales fueron ubicadas en la planta piloto del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (16°45'26.8"N, 93°10'20.3"W, altitud de 600 m.s.n.m), y fueron mantenidas a temperatura ambiente. La reproducción y desarrollo de las lombrices se realizó usando Peat-Moss como soporte y excreta de conejo como sustrato de acuerdo a lo recomendado por Villalobos-Maldonado *et al.* (2015).



Figura 6 . Área de alimentación y desarrollo de lombrices a base de Peat-Moss y excreta de conejo. A. lombrices de suelo, *Eisenia foetida*. B. Cunas de reproducción de lombrices

5.2 Aislamiento y cultivo de bacterias asociadas al intestino de la lombriz de suelo *Eisenia foetida*.

5.2.1. Ubicación del experimento.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio 1 del Polo Biotecnológico, ubicado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez., donde se cuenta con infraestructura para análisis fenotípico y genotípico de microorganismos.

5.2.2. Aislamiento y cultivo de cepas.

Aproximadamente 1.0 g, de contenido intestinal de tres lombrices se agregaron a 9.0 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón, obteniendo una solución stock de 10^{-1} , siguiendo el protocolo de Brito-Vega (2010) y entonces a partir de la solución base se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-8} de donde se tomaron las concentraciones 10^{-3} - 10^{-6} para transferir inóculo a diferentes medios de cultivo sólido y continuar con la etapa de aislamiento.

La inoculación a medios solidos se realizó por la técnica de estría cruzada, tomando 5.0 μ L de muestra de las diferentes concentraciones ya mencionadas. Los medios de cultivo utilizados fueron, Agar Nutritivo (AN), Agar Infusión Cerebro Corazón (ICC), Agar Rojo Congo (RC) y Agar Soya Trypticaseína (AST), que se caracterizan por ser medios de cultivo nutritivos para el crecimiento y desarrollo de bacterias de alta y de baja exigencia (Brito-Vega 2010).

Una vez inoculadas las bacterias a los medios de cultivo, se comenzó con el proceso de purificación, resembrando las cepas en cada uno de los medios donde se cultivaron. Esto fue, transferir las colonias diferentes morfológicamente a medios inocuos, mediante la misma técnica de estriado. Cuantas veces fue necesario, hasta obtener colonias uniformes y puras en cada uno de los medios utilizados.

La morfología de las colonias en el medio de cultivo fue analizado. Así también, la pureza de las colonias se verificó mediante Tinción de Gram y exploración al microscopio compuesto fotónico (Carls Zeiss, M.3500, USA) usando objetivo de inmersión-1500 X (ver anexo).

5.3 Extracción de ADN y análisis de huellas genómicas de bacterias endosimbióticas aisladas de *E. foetida*.

5.3.1 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de cada una de las cepas purificadas, se realizó mediante el kit comercial ZYMO® Research, (Fig.7). Posteriormente la calidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X al 1%, y analizado en un fotodocumentador UV-320 nm.

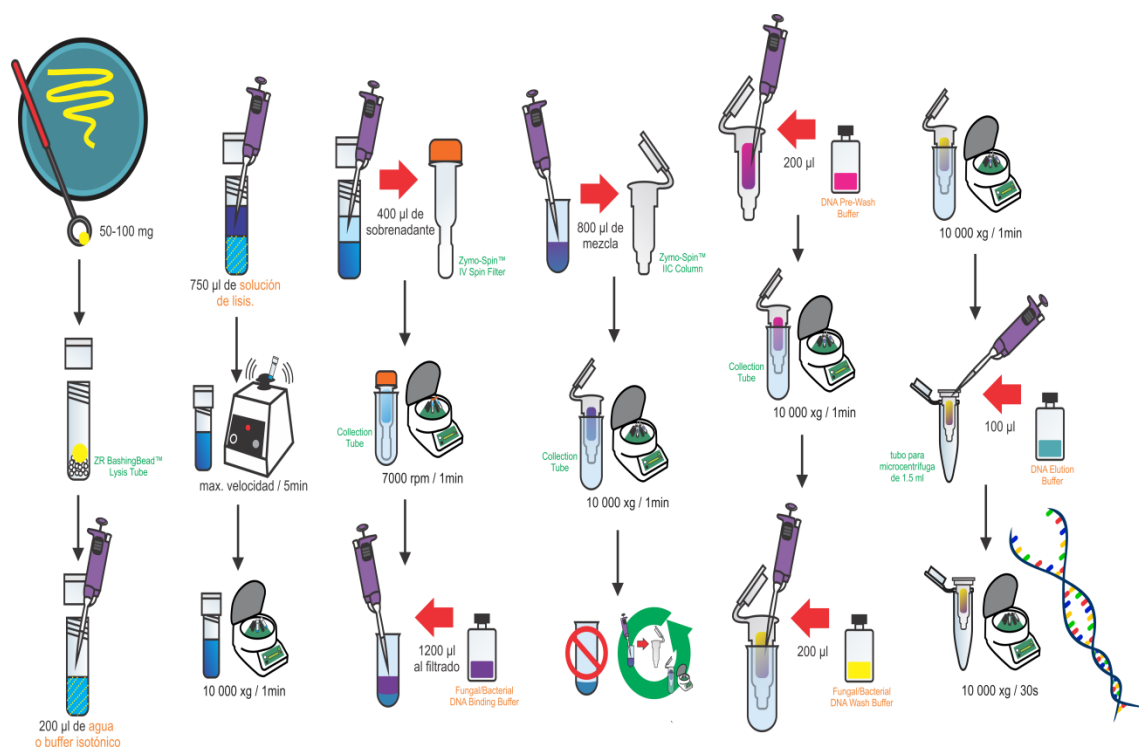


Figura 7. Metodología generalizada del proceso de extracción de ADN genómico de las cepas bacterianas, mediante el uso del Kit comercial Zymo® Research.

5.3.2 Huellas genómicas PCR_ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

Las secuencias repetitivas del genoma de cada una de las cepas aisladas del intestino de la lombriz de suelo *E. foetida* fue analizada mediante la técnica descrita por Bruijn (1992). Inicialmente se preparó una reacción de carga, con un volumen de 25 μL . en un microtubo Eppendorf de 0.2 mL; se adicionó 2.5 μL de solución buffer 10X; 2.5 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO al 1%); 3.8 μL de Cloruro de Magnesio (MgCl_2); 3.1 μL de desoxinucleótidos (d'NTP's; 100mM); primer's ERIC 1R (10 pM) y ERIC 2 (10 pM) , 0.5 μL respectivamente; 0.2 μL de Taq DNA Polimerasa ThermoScientific® ; 2.0 μL de DNA genómico y se aforó a 25 μL con 9.9 μL H_2O mQ. Las huellas genómicas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X al 1%, con ayuda de un fotodocumentador UV-320 nm.

En la figura 8 se muestran las condiciones de la PCR_ERIC para análisis de huellas genómicas.

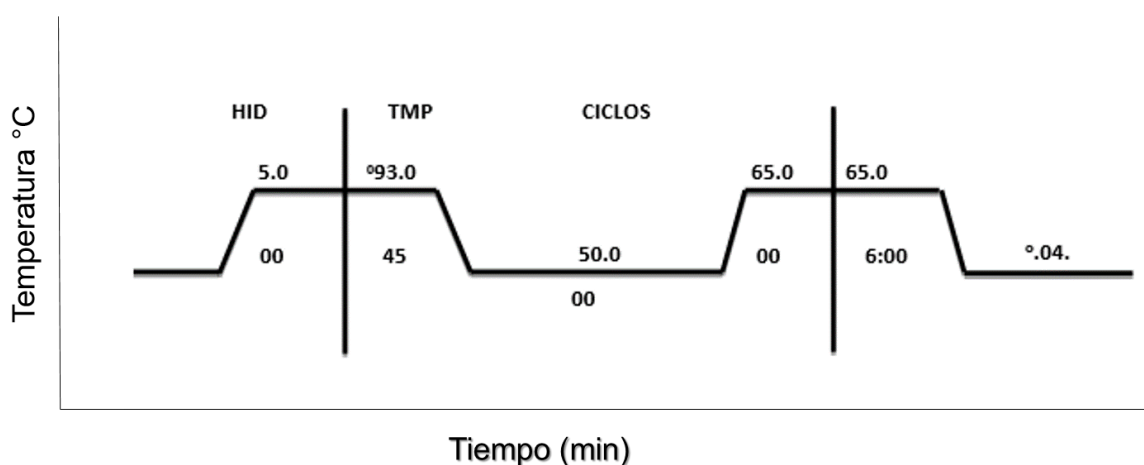


Figura 8. Condiciones utilizadas en termociclador, para la amplificación de secuencias consenso, mediante la PCR_ERIC.

5.3.3 Amplificación del gen 16S rARN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La amplificación del gen cromosomal 16S rARN se realizó para cada una de las cepas representantes (cepas Tipo) del agrupamiento de cepas realizado con PCR_ERIC. Se agregó en tubos Eppendorf de 0.2 mL lo siguiente: 0.2 μ L de dNTP's; Los primers utilizados fueron Fd1 y Rd1, 0.25 μ L respectivamente; 0.75 rARN μ L Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$); 2.5 μ L Buffer 10X; Taq polimerasa 0.125 μ L; todo esto a un volumen de 25 μ L; aforando con 20.92 μ L de H_2O mQ. Las condiciones de la PCR son las siguientes. Fig. 9:

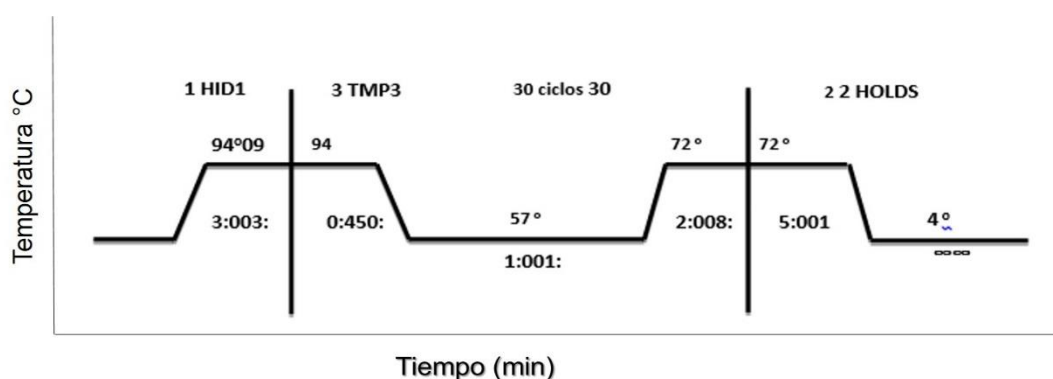


Figura 9. Condiciones utilizadas en termociclador, para la amplificación del gen 16S rRNA, mediante la PCR.

5.3.4 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

El producto de PCR, del gen 16S rARN de cada una de las cepas seleccionadas, se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL; 1.0 μ L de solución buffer 10X; 0.3 μ L de enzima Rsa I en una concentración de 0.37 g/mL; 1.5 μ L de producto de PCR y se aforó a 10.0 μ L con 7.2 μ L de H_2O mQ; se mantuvo a 37° durante 12 h para una buena actividad de la enzima. Las huellas genómicas fueron analizadas por medio de una electroforesis usando gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X y los perfiles fueron observados con la ayuda de un fotodocumentador UPK usando luz UV-320.

5.4 Secuenciamiento y Análisis Filogenético.

Los productos purificados de la PCR del gen 16S rARN (~1,500 bp) fueron secuenciados por la Unidad de Secuenciamiento Masivo del Instituto de Biotecnología (SSU-IBT-UNAM, México). Las secuencias fueron editadas con el BioEdit v.7.0.0 (Hall, 1999). La Herramienta de Alineamiento de Básica Local (BLAST) del NCBI-(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y secuencias tipo obtenidas del Proyecto de Base de Datos Ribosomal (<http://rdp.cme.msu.edu>) fueron usadas para búsqueda de secuencias similares. Las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL_X v1.8 (Thompson *et al.*, 1997). El Análisis filogenético y evolución molecular fue realizado con MEGA v. 5.2. (Kumar *et al.*, 2004). El árbol filogenético fue construido con las secuencias del gen 16S rARN de cada una de las cepas usando el método Neighbour-Joining con 1000 pseudoréplicas y con el modelo evolutivo Tamura-Nei (Kimura, 1980).

5.5 Análisis estadístico de datos.

Los datos obtenidos en este trabajo, relacionados con el estudio fenotípico y genotipo de las cepas bacterianas aisladas de la lombriz de suelo *Eisenia foetida* fueron analizados estadísticamente mediante estimadores de tendencia central y desviación estándar con un nivel de significancia de alfa= 0.05. Se utilizó el software Statgraphic Centurion v. XV.2

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cepas aisladas y su morfología macroscópica

Se obtuvieron 74 cepas endobacterianas puras de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* de las cuales 24 cepas crecieron en medio Agar Nutritivo (AN), 21 cepas en Agar Rojo Congo (RC), 15 cepas en Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) y 14 cepas en Agar Tripticaseína de Soya (TSA). El crecimiento de las cepas en los distintos medios y su variación en número se relaciona con la diversidad de bacterias en el intestino de *Eisenia foetida* ya que la cantidad de colonias de bacterias cultivables corresponde a la demanda de nutrientes en su hábitat, así como los parámetros químicos y bioquímicos de estos son factores importantes para el crecimiento de las bacterias (Koubová, Chronaková, Pizl, Monedero, & Elhottová, 2015). Se observó el fenotipo de cada una de estas cepas cultivadas y están representadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Bacterias representantes de los grupos obtenidos de las pruebas ERIC_PCR.

No.	Cepa	Morfología de las colonias			
		Tamaño mm	Color	Morfología	Tinción de Gram
1	AN-05	3-5	Crema	Redondas, bordes irregulares, planos, cremosos.	Gram (-) bacilos normales, agrupados, abundantes.
2	AN-11	5-7	Crema	Redondas, bordes irregulares, cremosos, planos.	Gram (+) Bacilos alargados en grupos de 2 – 4, no abundantes
3	AN-12	5-7	Blancas	Redondas, cremosas, bordes irregulares, planas.	Gram (+) Bacilos normales no tan abundantes en grupos y por unidades.
4	AN-15	3-5	Crema	Redondas, bordes irregulares, cremosos y planas.	Gram (+) borde azul centro transparente (algunas), cocos no agrupados, abundantes.

5	RC-08	1-2	Rojas	Redondas regulares, profundas	Gram (+) espirilos no abundantes
6	RC-10	1-3	Rojas	Redondas regulares, planas.	Gram (+) espirilos no abundantes
7	ST-01	1-2	Crema-blancas	Redondas, regulares, planas, profundas.	Gram (-) cocos agrupados, abundantes
8	ICC-01	3-5	Amarillo-beige	Redondas, bordes regulares, punto central más concentrado (color).	Gram (+) espiroquetas, abundantes
9	ICC-05	3-5	Crema-transparentes	Redondas, bordes regulares, planos.	Gram (-) espiroquetas, abundantes
10	AN-09	3-5	Crema	Redondas, irregulares, cremosas, con elevación	Gram (+) bacilos agrupados, abundantes.
11	ICC-07	1-2	Crema-transparentes	Redondas, bordes regulares, planos, profundas.	Gram (+) bacilos, agrupados, no abundantes
12	AN-24	3-5	cremas	Redondas, planas, bordes irregulares,	Gram (-) cocos no agrupados, abundantes.
13	RC-15	1-3	Rojas	Redondas regulares, planas.	Gram (+) espiroquetas no abundantes
14	RC-20	1-3	Rojas	Redondas, regulares, planas.	Gram (+) espiroquetas no abundantes
15	RC-06	1-3	Crema	Cremosas, redondas, bordes regulares,	Gram (-) cocos agrupados, abundantes
16	ST-05	1-3	Crema	Cremosas, Redondas, bordes regulares, planas	Gram (-) cocos agrupados, abundantes

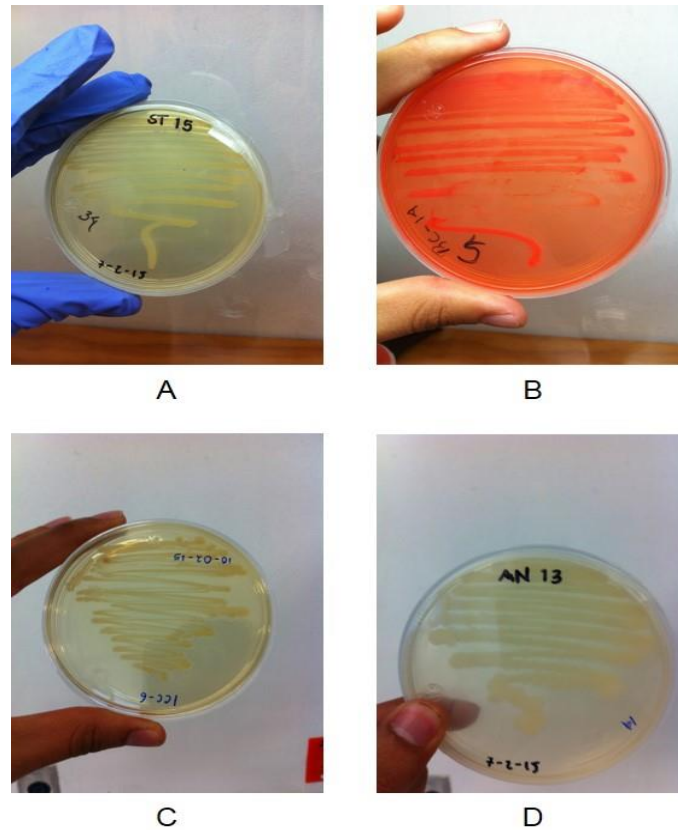


Figura 10. Cepas bacterianas creciendo en los diferentes medios de cultivo. A. Medio Agar Soya Trypticaseína B. Agar Rojo Congo C. Caldo Infusión Cerebro Corazón D. Agar Nutritivo.

6.2 Características genómicas del ADN extraído de Endobacterias de *Eisenia foetida*

El ADN obtenido para el análisis molecular fue visualizado en geles de agarosa para determinar su calidad y cantidad (Fig. 11). En todos los geles, el primer carril corresponde al marcador molecular ADN de 1 kb y en los siguientes el ADN total de cada una de las cepas estudiadas. El procedimiento de extracción de ADN fue adecuado y permitió obtenerlo una cantidad de ADN de aprox. 120 µg/ml que corresponde a 13000 nucleótidos. Para fines, de realizar pruebas, tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se requiere de una concentración determinada de ADN para una adecuada amplificación de genes, tales como el 16S rRNA. Martin-Didon *et al.*, (2005), señalan que altas concentraciones de ADNt pueden inhibir la eficiencia de la Taq DNA polimerasa y provocar que no se logre amplificar el gen estudiado.

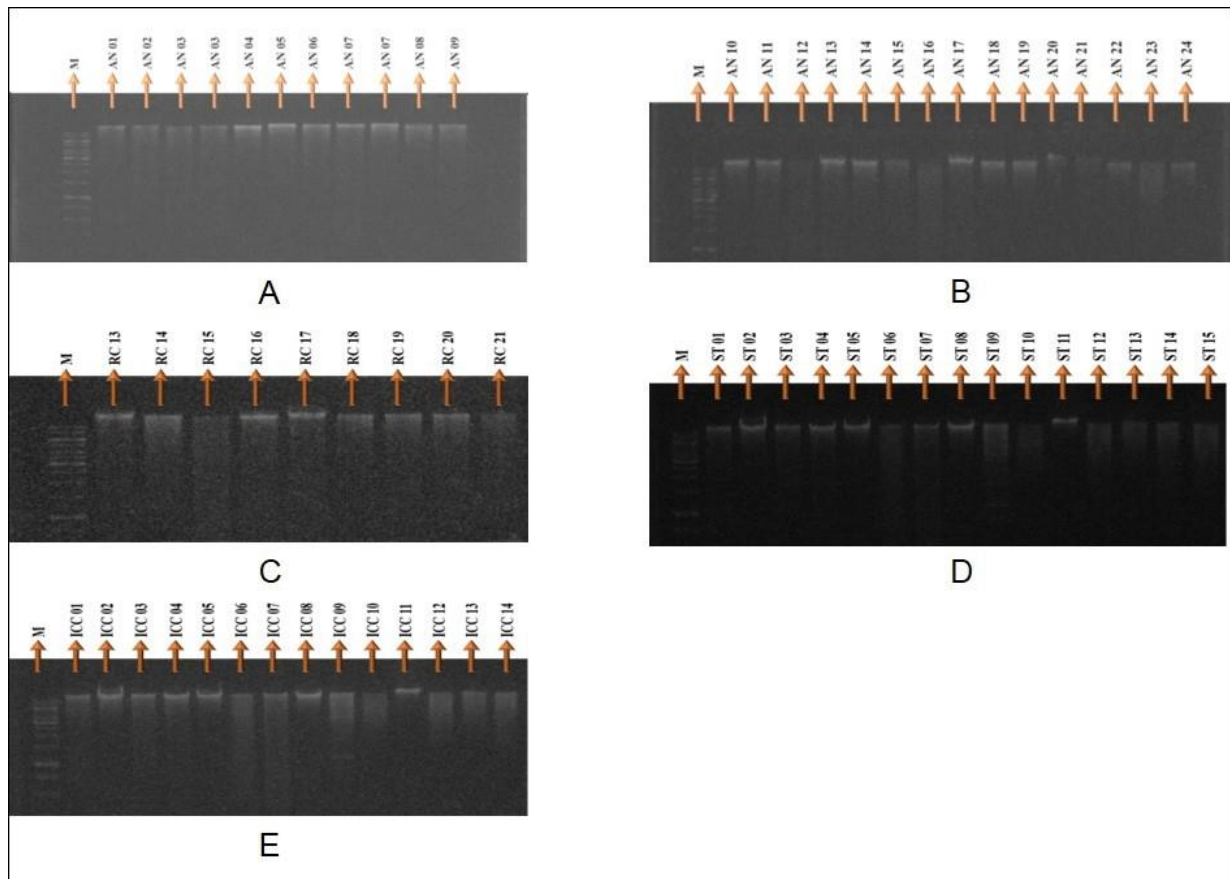


Figura 11. ADN total genómico extraído de endobacterias del Intestino de *Eisenia foetida* cultivadas en medio AN y analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. A. Cepas AN 01-AN 09 B. Cepas AN 10- AN 24 C. Cepas RC 15- RC 21 D. ST 01- ST 15 E. Cepas ICC 01- ICC 14.

En la figura 11 se observan las electroforesis de del ADN total de las cepas aisladas del intestino de *Eisenia foetida*, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los siguientes el ADN total de las cepas.

6.3 Huellas genómicas ERIC_PCR

Las huellas genómicas generadas usando ERIC_PCR permitieron distinguir 16 patrones genómicos diferentes entre las 74 cepas aisladas de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Tabla 3). Las condiciones establecidas para el ADN facilitaron y mejoraron la amplificación de las huellas genómicas de las endobacterias estudiadas por PCR.

Tabla 3. Grupos formados a partir de los patrones de huellas genómicas obtenidos a partir de ERIC_PCR

Grupos	Cepas con el mismo patrón de huellas genómicas							
Grupo I	AN-05	AN-07	AN-17	AN-04	AN-16	AN-19	AN-22	
Grupo II	AN-11	AN-02	AN-03	AN-08	AN-10	AN-13	AN-14	AN-18
Grupo III	AN-12	AN-21	AN-23					
Grupo IV	AN-15	RC-01	RC-03	RC-04	RC-05	RC-07		
Grupo V	RC-08	RC-09	ICC-09	ICC-10				
Grupo VI	RC-10	RC-11	RC-12	ICC-14				
Grupo VII	ST-01	ICC-06	ICC-08	ICC-11	ICC-13			
Grupo VIII	ICC-01	ICC-02						
Grupo IX	ICC-05	ICC-04	ST-13	ST-12	ST-03	ST-02		
Grupo X	AN-09	ICC-12	RC-13	RC-14				
Grupo XI	ICC-07	ICC-03	ICC-12	ST-14	ST-15			
Grupo XII	AN-24	AN-01	AN-20	AN-06				
Grupo XIII	RC-15	RC-16	RC-17					
Grupo XIV	RC-20	RC-02	ST-04					
Grupo XV	RC-06	RC-18	RC-19					
Grupo XVI	ST-05	ST-06	ST-07	ST-08	ST-09	ST-10	ST-11	

El grupo II, agrupó un total de 8 cepas bacterianas con el mismo patrón genético, seleccionándose la cepa AN-11 como la cepa que representa a este grupo. Todas las cepas que conformaron el grupo II fueron aisladas en el medio agar nutritivo (AN). En cambio el grupo VIII agrupó el menor número de cepas (2 endobacterias). En este grupo la cepa representante fue ICC-01 y estas cepas crecieron en el medio Infusión Cerebro Corazón (ICC). Las huellas genómicas ERIC permiten discriminar a nivel de cepas y evita trabajar con cepas similares o clonas.

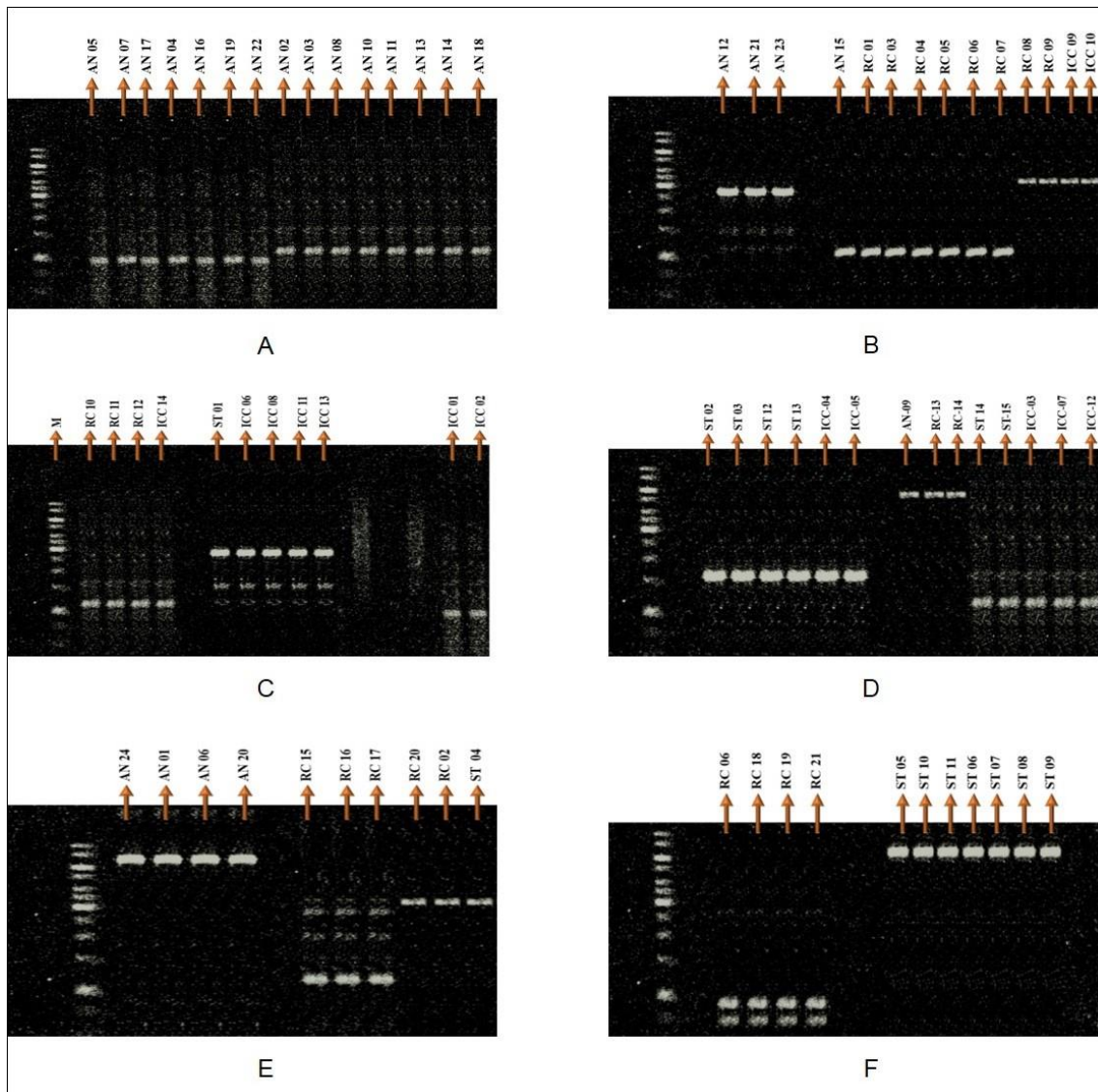


Figura 12.Perfiles genómicas de cepas endobacterias aisladas del Intestino de *Eisenia foetida* en diferentes medios de cultivo. Las imágenes corresponden a geles de agarosa al 1% en TAE IX. A. Cepas que conforman el Grupo I, II B. Cepas correspondientes a los grupos III, IV, V. C. Cepas correspondientes a los grupos VI, VII, VIII. D Cepas correspondientes a los grupos IX, X, XI. E. Cepas correspondientes a los grupos XII, XIII, XIV. F. Cepas correspondientes a los grupos XV, XVI.

En la tabla 3 se puede observar que el grupo I, II, III y XII, crecieron principalmente en el medio AN. El medio Agar nutritivo (AN) es considerado un medio de cultivo nutritivo no selectivo, y permite el crecimiento una importante diversidad de bacterias, en este medio la pluripectona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y nutrientes para el desarrollo bacterias, además de no contener inhibidores para el desarrollo de estas mismas (Brito-Vega, 2010).

Parthasarathi *et al.*, (2007) aisló bacterias de *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida* y *Perinoyx excavatus* y encontró resultados similares.

También, se observó que miembros del grupo XVI fueron aislados en el medio ST. El medio ST provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, se caracteriza por su combinación de caseína y peptonas de soya que lo hace altamente nutritivo al suministrar nitrógeno orgánico, en especial aminoácidos y péptidos de cadena más larga, por lo cual es un medio muy enriquecido pero no diferencial. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico (American Type Culture Collection, 2006). El medio ST ha sido empleado en el aislamiento de muestras de *Pontoscolex corethrurus* y principalmente se han aislado bacterias del tipo *Acinetobacter sp.*, y *Bacillus cereus* (Brito-Vega, 2010).

6.4 Amplificación del gen 16S rRNA

Un cepa de cada grupo genómico (ERIC) fue utilizado para amplificar el gen 16S rRNA por PCR. En la figura 13, se observan los amplicones de cada una de las cepas estudiadas. Los primers Fd1 y Rd1 empleados para amplificar de manera independiente el gen 16S rRNA de los aislamientos de la colección estudiada y seleccionados por su especificidad (Lenstra, y otros, 2012), permitieron obtener como productos de PCR fragmentos de ADN del tamaño esperado (≈ 1500 pb). Aunado a esto el gen 16S rRNA permite inferir las relaciones filogenéticas entre organismos cercanos y distantes (Janssen, 2006).

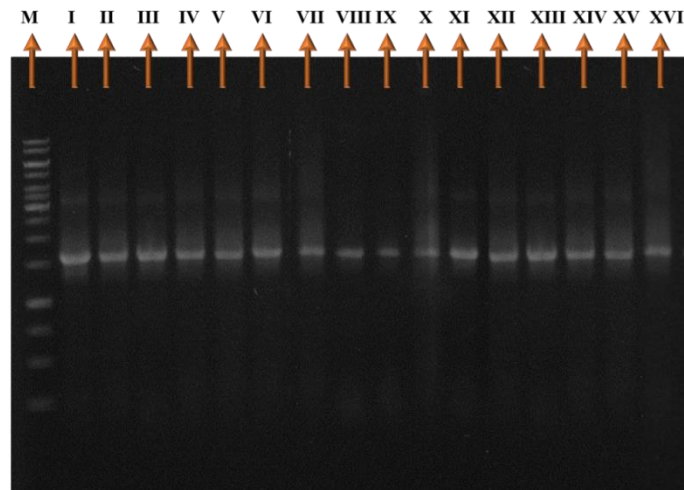


Figura 13. Amplificación del gen 16S rRNA de endobacterias aisladas del Intestino de *Eisenia foetida* en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Los amplicones corresponden a una extensión de 1500 pb aprox.

El gen cromosomal 16S rRNA, es un marcador molecular utilizado comúnmente para estudios filogenéticos de bacterias. Este marcador se caracteriza por presentar muy pocas mutaciones a través del tiempo y es muy conservado (Zhu, Bilgin, & Snyder, 2009). Ihssen *et al.*, (2008) emplearon el gen 16S rRNA para estudiar la diversidad genética de bacterias endosimbióticas del intestino de la lombriz de tierra *Aporroctodea caliginosa* y lograron determinar eficientemente el status taxonómico de los aislados.

El análisis de la secuencia de los rRNA y la comparación de las secuencias de los 16S rRNA permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes. Esta herramienta se ha venido utilizando recientemente en microbiología clínica, fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnica resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo (Rodicio & Mendoza, 2005)

6.5 Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción de los Productos de PCR amplificados fue determinado usando la enzima Rsa I, se obtuvieron 7 patrones distintos.

En la tabla 4 se observa que el patrón de restricción con más repeticiones fue el grupo I, y se eligieron 7 cepas representantes de cada uno de los grupos

(cuadros sombreados) que se enviaron a secuenciar y posteriormente se realizó el análisis filogenético. La técnica de RFLP fue el primer método de tipificación de ADN usado en las pruebas de identidad humana, también ha sido de amplio uso en la identificación de microorganismos (Gómez-Rodríguez & Pérez, 2008). Además permite discriminar a nivel de especie, ya que el gen 16S rRNA ha sido seccionado por la enzima de restricción y permite ver segmentos del gen que son únicos para cada especie. Es común en empleo de enzimas (endonucleasas) para estudios filogenéticos, ya que ofrecen resultados confiables (Blair & Murphy, 2011). Con esta técnica ha sido estudiada una diversidad de especies bacterianas de muestras biológicas y también para muestras ambientales (agua, suelo, residuos orgánicos, etc.). Depkat-Jacob *et al.*, (2010) reporta el empleo de RFLP para estudiar diversidad en el intestino de lombrices de tierra *Lumbricus terrestris* y *Lumbricus rubellus* y encontró *Mycobacterium* y *Actinobacteria*.

Tabla 4. Grupos obtenidos a partir de los patrones de restricción de RFLP

GRUPOS		CEPAS					
I	AN-05	AN-07	AN-17	AN-04	AN-16	AN-19	AN-22
II	AN-11	AN-12	AN-15	RC-15			
III	ICC-15						
IV	ICC-13	RC-06					
V	ICC-01						
VI	ICC-05						
VII	ST-06	RC-02	RC-04	RC-05	RC-20		

6.6 Resultado de la purificación del gen 16S ADNr

Después de realizar el análisis de restricción enzimática del gen 16S ADNr (RFLP), se eligieron 7 cepas representativas para su secuenciación en la Unidad de Secuenciamiento Masivo del Instituto de Biotecnología (UNAM), y posteriormente fueron purificados. Los fragmentos del gen obtenido fueron de aprox. 1500 pb y registraron por lo menos 120 ng de producto de PCR, que es suficiente para el proceso del secuenciamiento. (Fig. 14.)

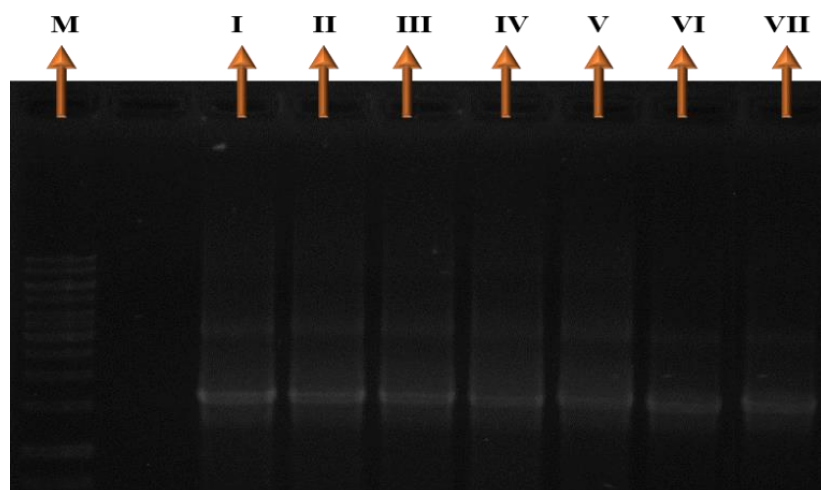


Figura 14. Electroforesis de los fragmentos del gen 16S rARN purificado.

6.7. Análisis filogenético

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de las 7 cepas endobacterias aisladas del intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* revelaron que los aislados pertenecen a cuatro géneros bacterianos (Fig.15). Las cepas AN-11 pertenece al género *Bacillus*, con 98.0 % de similitud con *Bacillus salmalaya* 139SI (KM051837.1). La cepa ICC-05 fue agrupada con miembros del genero *Caryophanus/Solibacillus* y tuvo 99.6 % de similitud con *Caryophanus* sp. AS70 (AB727947.1).

Las cepas ICC-13 e ICC-15 se agruparon con bacterias del genero *Paenibacillus*. La cepa ICC-13 tuvo un 99.2% con la especie *Paenibacillus pabuli* (AB045094.1) y la cepa ICC-15 fue similar en un 98.5% con *Paenibacillus amilolyticus* (D85396.2).

Las cepas AN-05, ST-06 e ICC-01 se agruparon con miembros del genero *Pseudomonas*. La cepa AN-05 fue similar en 99.0% con *Pseudomonas citronellolis* (Z76659), la cepa ICC-01 tuvo una identidad genética de 98.0% a la cepa *Pseudomonas lini* CFBP5737 (AY035996.2) y la cepa ST-6 se afilio con especies de *Pseudomonas*, pero se requiere mejorar este tipo de estudios para definir su estatus taxonómico. Con respecto a la filogenia de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* diversos estudios se han publicado sobre el uso de *Bacillus* en biorremediación, Singh *et al.*, (2013) reportó que el género

Bacillus mostró potencial de degradación del pesticida malatión en suelos contaminados en el cual se destaca el incremento de su actividad en cultivos mixtos con *Lysinibacillus sp.*, y *Brevibacillus sp.* En estudios más recientes se ha reportado que *Bacillus salmalaya* puede producir biosurfactantes para biodegradación de hidrocarburos, los cuales presentaron altas propiedades fisicoquímicas y altos índices de emulsificación, cabe destacar que cada cepa se adaptó a un pH específico, dependiendo del tipo correspondiente de biosurfactante y tal especificidad facilitó la biodisponibilidad de compuestos orgánicos para la bacteria, acelerando la biodegradación de los hidrocarburos (Dadrasnia & Ismail, 2015).

Con respecto a *Solibacillus silvestris* Markande *et al.*, (2013) encontraron que esta cepa aislada del sedimento interno de un ambiente estuarino, produce una glicoproteína polimérica extracelular que tiene propiedades bioemulsificantes contra un amplio rango de hidrocarburos. Este es el primer reporte de una proteína que exhibe actividad bioemulsificante siendo producida por un miembro del género *Solibacillus*. Esta cepa produce un bioemulsificante que forma emulsiones estables en varias condiciones físicas, y esos atributos pueden tomar ventaja en aplicaciones cosméticas, farmacéuticas y ambientales. La cepa *Bacillus silvestris* aislada de cangrejo del Océano Pacífico tiene la capacidad de producir sustancias inhibitorias de células cancerígenas. Estas sustancias tienen estructuras únicas que son dos ciclodepsipéptidos designados también como bacillistatinas. Ilustrativamente son ejemplos recientes de sustancias antineoplásicas de bacterias marinas específicamente *Bacillus silvestris* y que presentan actividad inhibitoria de una línea de células cancerígenas. Miembros del género *Bacillus* son comunes tanto en sedimentos marinos, como terrestres, *Bacillus silvestris* fue identificado por primera vez en 1999, cuando fue aislado de una muestra de suelo en Alemania, y más recientemente fue identificado en muestras de agua tomadas de la parte sur del Mar Báltico, un ambiente salobre (Petitt, y otros, 2010).

Otra de las cepas identificadas genéticamente *Panibacillus illinoisensis* se le ha relacionado con la resistencia a solventes orgánicos, mediante la producción de Ciclodextrina glucanotransferasa (CGTase) éstas han sido ampliamente usadas en el campo de los alimentos, farmacéutica, agroquímica, cosméticos y

perfumes por su capacidad de formar complejas inclusiones con una amplia variedad químicos que parcialmente encapsula dentro de sus cavidades. La cepa *Panibacillus illinoisensis* se aisló de muestras de suelo de Kanto, Japón, esta produce CGTase en un medio sobrecargado con n-hexano. Los microorganismos resistentes a solventes orgánicos son útiles para el screening de enzimas extracelulares en presencia de solventes orgánicos (Doukyu, Kuwahara, & Aono, 2006). En otros estudios Weid *et al.*, (2006) reportaron actividad antimicrobiana de *Paenibacillus peoriae* sobre un amplio espectro de bacterias fitopatogénicas y hongos, entre las cuales se encuentran *Micrococcus sp.* y *Agrobacterium tumefaciens*. Este es el primer reporte de producción de sustancias antimicrobianas en *P. peoriae*. Además de la capacidad de la inhibición antimicrobiana, la cepa es capaz de fijar nitrógeno efectivamente, y producir quitinasas y proteasas, convirtiéndolo en un promotor del crecimiento de plantas y/o como un agente de control en experimentos de campo.

Nousiainen *et al.*, (2015) encontraron que cepas de *Pseudomonas citronellis* aisladas de sitios contaminados por fangos de hidrocarburos, tienen la capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo (TPH), estos fangos están formados por varios componentes de hidrocarburos tóxicos por lo que los sitios contaminados son una de las principales preocupaciones sobre el medio ambiente, debido a que muchos de estos componentes son carcinogénicos y potentes inmunotóxicos. Las cepas aisladas de *Pseudomonas citronellis* degradaron TPH en un rango de 65% a un 96% lo que indica una importante capacidad de degradación. Literatura reciente Baker & Satish (2015) reportan que la especie *Pseudomonas veronii* una novel endófito ha sido aislada de *Annona squamosa L.* y ha presentado capacidad de sintetizar extracelularmente nanopartículas de oro. Las nanopartículas de oro se ha reportado que soportan innumerables aplicaciones en terapéutica, catálisis, biosensores, farmacología, tratamientos del cáncer, etc. La literatura reporta que la síntesis de nanopartículas está mediada por secreciones estructurales que contienen compuestos bioactivos, parámetros como pH, temperatura y concentración de los cultivos bacterianos influyen para lograr nanopartículas de oro estables. La biosíntesis de nanopartículas de oro por *Pseudomonas veronii* mostró actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli*.

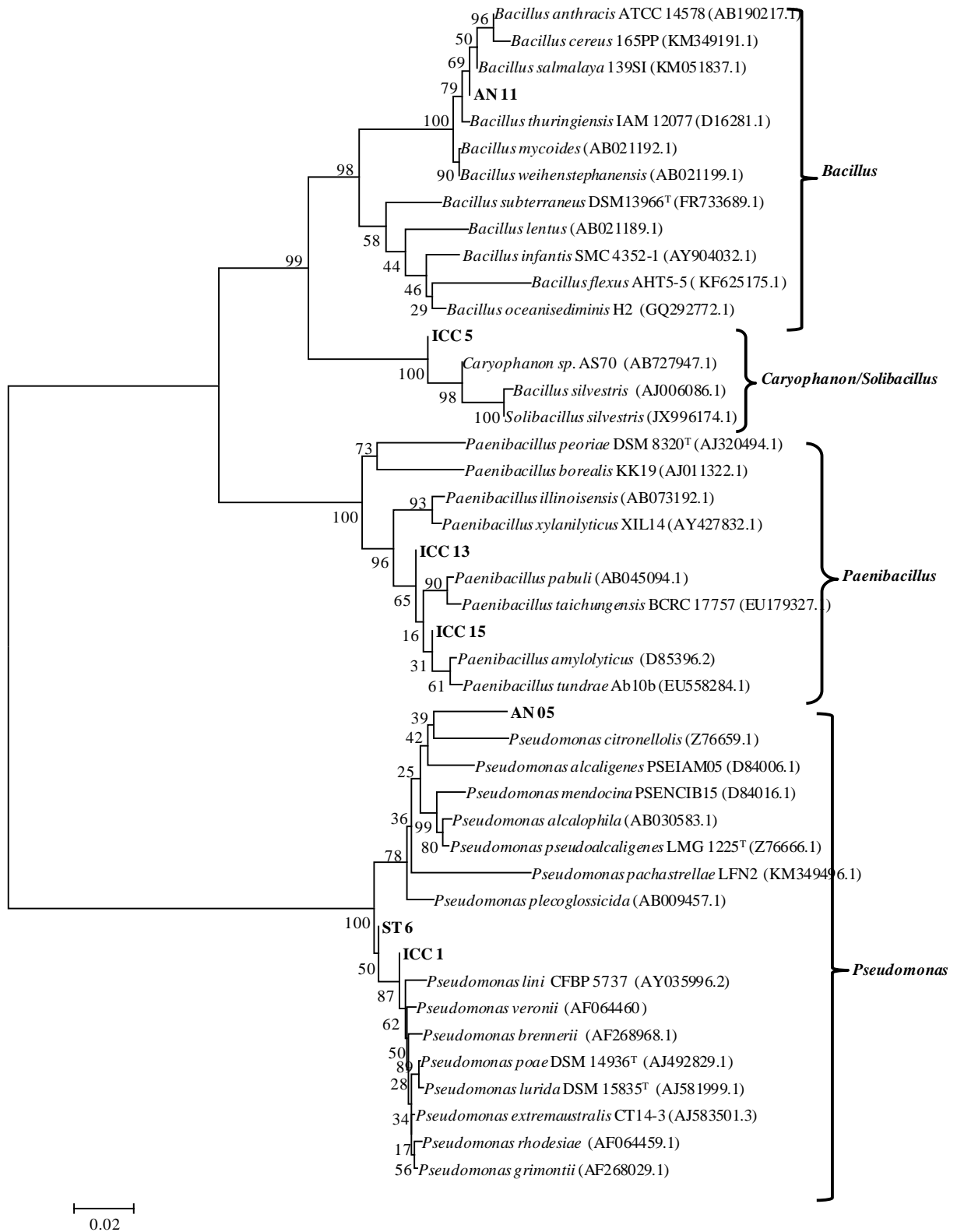


Figura 15. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de las endobacterias asociadas al Intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* L. Las cepas están remarcadas en letras negras.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 74 cepas endobacterianas del intestino de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* de las cuales 24 cepas crecieron en medio Agar nutritivo, 21 cepas en Agar Rojo Congo, 15 en Caldo Infusión Cerebro Corazón y 14 en Agar Tripticaseína de Soya. Los aislados mostraron diferentes morfologías celulares y la mayor parte resultaron ser bacilos Gram (-), con excepción de bacterias agrupadas en el género *Bacillus* que fueron Gram (+). En el medio Agar Nutritivo fue donde se observó el mayor número de desarrollo de cepas.

La prueba de ERIC_PCR permitieron obtener 16 patrones de huellas genómicas distintos, que posteriormente con el análisis de restricción (RFLP) se obtuvieron 7 patrones de restricción, los que en conjunto permitieron conocer la biodiversidad genética del intestino de la lombriz *Eisenia foetida*.

De acuerdo al análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA que se realizó a las 7 cepas representantes, éstas pertenecieron a 4 géneros distintos, *Bacillus*, *Caryophanon/Solibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, el género en el que se agruparon la mayor cantidad de aislados fue *Bacillus*, esto pudo deberse a las características propias del género ya que *Bacillus* es una bacteria gran positiva esporulada que puede vivir como aerobio estricto o anaerobio facultativo. Aunado a esto las propiedades del medio en el que se desarrolla (AN) propicia un buen desarrollo y crecimiento de *Bacillus*.

La importancia de la biodiversidad bacteriana de *E. foetida* radica en las aplicaciones que puedan desarrollarse por medio de su actividad ya sea de manera mutualista o simbiótica con otros organismos, la diversidad bacteriana caracterizadas en este estudio tiene potencial en distintas aplicaciones como biorremediación, aplicaciones médicas, farmacológicas, cosméticas, alimentos etc., estudios adicionales se requieren para elucidar los factores que intervienen y el papel que juegan estas bacterias en estos procesos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*, 431-440.
- American Type Culture Collection. (2006). Type Culture Collection. Maryland, USA: BENEX Limited.
- Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C., Arancon, N., & Metzger, J. (2005). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Soil Ecology Laboratory*, 188-215.
- Baker, G., Smith, J., & Cowan, D. (2003). Review and re-analysis of domain specific 16s primers (Review article). *Journal of Microbiological Methods*, 1-18.
- Baker, S., & Satish, S. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Pseudomonas veronii* AS41G inhabiting *Annona squamosa* L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 691-695.
- Bartlett, M. D. (2010). A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. *European Journal of Soil Biology*, 67-73.
- Behr, M., Manges, A. R., Labbe, A., V.G., L., Masson, L., & Brousseau, R. (2010). Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease. *Journal Infectious Diseases*, 1877-1884.
- Benn, J. (2010). What is Biodiversity? *UNEP*, 1-8.
- Binneck, F., Bot, B. L., & Monard, C. (2010). Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *The ISME Journal*, 1048-1056.
- Blair, C., & Murphy, R. W. (2011). Recent Trends in Molecular Phylogenetic Analysis: Where to next? *Journal of Heredity*.
- Bonilla-Rosso, G., Souza, V., & Eguarte, L. E. (2008). Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La nueva Ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 41-51.
- Bonkowski, G. M. (2000). Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, 666-676.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 601-608.
- Brito-Vega, H. (2010). Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

- Brito-Vega, H., & Espinosa-Victoria, D. (2009). Bacterial Diversity in the Digestive Tract of Earthworms (Oligochaeta). *Journal of Biology Sciences*, 192-199.
- Brown, G. G., Benito, N. P., Pasini, A., Sautter, K. D., & Torres, E. (2006). No-tillage greatly increases earthworm populations in Paraná state, Brazil. *Pedobiología*, 764-771.
- Buck, H., Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2005). Protection of soil carbon by microaggregates within earthworms casts. *Soil Biology & Biochemistry*, 251-258.
- Byzov, B. A., Thanh, V. N., & Babveja, I. P. (2009). Yeasts associated with soil invertebrates. *Biology and Fertility of Soils*, 183-187.
- Caliskan, M. (2012). DNA Based Techniques for Studying Genetic Diversity . En A. L. Abdel-Mawgood, *Genetic Diversity in Microorganisms* (págs. 95-121). Egipto: InTech.
- Curry, J. P., & Schmidt, O. (2007). Relationship between earthworm populations and management intensity in cattle-grazed pastures in Ireland. *Applied Soil Ecology*, 58-64.
- Dadrasnia, A., & Ismail, S. (2015). Biosurfactant Production by *Bacillus salmalaya* for Lubricating Oil Solubilization and Biodegradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9848-9863.
- Davidson, S. K. (2006). A global survey of the bacteria within earthworm nephridia. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 188-200.
- Depkat-Jacob, P. S., Hilgarth, M., Horn, M. A., & Drake, H. L. (2010). Effect of Earthworm Feeding Guilds on Ingested Dissimilatory Nitrate Reducers and Denitrifiers in the Alimentary Canal of the Earthworm. *Applied and Environmental Microbiology*, 6205-6214.
- Diab, A. M., & Al-Turk, I. M. (2011). ERIC and RAPD PCR-based DNA fingerprinting techniques application for microbial source tracking (MST) at Al-Madinah Al-Munwwarah, KSA. *Journal for Science of Taibah University*, 31-38.
- Domínguez, J., & Edwards, C. A. (2011). *Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting*. LCC: Taylor & Francis Group.
- Domínguez, J., & Pérez-Losada, M. (2010). *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia Andrei Bouché*, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 321-331.
- Doukyu, N., Kuwahara, H., & Aono, R. (2006). Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces Cyclodextrin Glucanotransferase resistant to organic solvents. *Bioscience. Biotechnology. Biochemical*, 334-340.
- Durán, L., & Henríquez, C. (2009). Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 275-281.

- Eijsackers, H. J. (2005). The effects of earthworm bioturbation on metal availability in river floodplains. Amsterdam: Elsevier.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 4117-4120.
- Fiolka, M. J., Zagaja, M. P., Piersiak, T. D., Wróbel, M., & Pawelec, J. (2010). Gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida: Oligochaeta) possesses antimycobacterial activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63-73.
- Gómez-Brandón, M., Lores, M., & Domínguez, J. (2012). Species-Specific Effects of Epigeic Earthworms on Microbial Community Structure during First Stages of Decomposition of Organic Matter. *PLoS ONE*, 7, 1-8.
- Gómez-Rodríguez, J. A., & Pérez, J. A. (2008). Bioprospección de enzimas de restricción en bacterias de suelos y ambientes volcánicos de Nicaragua. *Encuentro*, 70-87.
- Harrison, C. J., & Langdale, J. A. (2006). A step by step guide to phylogeny reconstruction. (A. D. Baxevanis, Ed.) *The Plant Journal*, 323-259.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 133-139.
- Hyun-Jung, K., Kwang-Hee, S., Chang-Jun, C., & Hor-Gil, H. (2005). Analysis of Aerobic and Culturable Bacterial Community Structures in Earthworm (*Eisenia foetida*) Intestine. *Agrochemical Biotechnology*, 137-142.
- Ihssen, J., Horn, M. A., Matthies, C., Göbner, A., Schramm, A., & Drake, H. L. (2008). N₂O-Producing Microorganisms in the Gut of the Earthworm *Aporroctodea caliginosa* Are Indicative of Ingested Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1665-1661.
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1719-1728.
- Jayasinghe, D., & Parkinson, D. (2009). Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*, 367-389.
- Jolly, J., Lappin-Scott, H. M., Anderson, J., & Clegg, C. (2008). Scanning Electron Microscopy of the Gut Microflora of Two Earthworms: *Lumbricus terrestris* and *Octolasion cyaneum*. *Microbiology & Ecology*, 235-245.
- Koubová, A., Chronaková, A., Pizl, V., Monedero, M. A., & Elhottová, D. (2015). The effects of earthworms *Eisenia* spp. on microbial community are habitat dependent. *European Journal of Soil Biology*, 42-55.

- Lavelle, P., Pashanasi, B., Charpentier, F., Gilot, C., Rossi, J. P., Deroruard, L., & Bernier, N. (2010). Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a landscape scale over decades. *Earthworm Ecology*, 145-160.
- Lenstra, J. A., Groeneveld, L. F., Eding, H., Kantanen, J., Williams, J. L., Taberlet, P., . . . Weigend, S. (2012). Molecular tools and analytical approaches for the characterization of genetic diversity. *Immunogenetics, Molecular Genetics and Functional Genomics*, 211-229.
- Luepromchai, E., Singer, A. C., Yang, C. H., & Crowley, D. (2006). Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *Microbiology Ecology*, 191-197.
- Markande, A., Acharya, S., & Nerurkar, A. (2013). Physicochemical characterization of a thermostable glycoprotein bioemulsifier from *Solibacillus silvestris*. *Process Biochemistry*, 1800-1808.
- Martin-Didonet, L. S., C.G., C., Souza, E., Kleina, M., & G.M, F. (2005). Genome Structure of the genus *Azospirillum*. *Research Gate*, 4113-4116.
- Martínez-Romero, E., Guerrero, M. G., Orrillo, E. O., & Martínez-Romero, J. (2007). Buffet Hypothesis for Microbial Nutrition at the Rhizosphere. *Research Topics*, 152-164.
- Masín, C. E., Rodríguez, A. R., & Maitre, M. I. (2011). Evaluación de la abundancia y diversidad de lombrices de tierra en relación con el uso del suelo en el cinturón hortícola de Santa Fe. *Ciencia del Suelo*, 211-239.
- Miles, M., Small, G., Sakonas, P., & Bucchi, R. (2008). The soil ecotoxicology of 1,3-dichloropropene under commercial growing conditions. *Community of Agrochemical Biology Science*, 777-785.
- Montgomery, D. R. (2007). Soil erosion and agricultural sustainability. *PNAS*, 183-192.
- Moreno-Reséndez, A. (Octubre de 2005). Origen, importancia y aplicación de vermicomposta para el desarrollo de especies hortícolas y ornamentales. Laguna, Coahuila de Zaragoza, México.
- Moreno-Reséndez, A., & Cano-Ríos, P. (2002). Tasa reproductiva de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en diferentes substratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 41-46.
- Neilson, R., B.Boag, Legg, R., & Chambers, S. (2005). Distribution, prevalence and intensity of earthworm populations in arable land and grassland in Scotland. *Annals of Applied Biology*, 153-165.
- Niemann, H., Carnwath, J., Schwarz, S., & Terletski, V. (2005). Subtracted restriction fingerprinting--a tool for bacterial genome typing. *Biotechniques*, 304-310.
- Nogales, R., Cifuentes, C., & Benítez, E. (2005). Vermicomposting of winery wastes: A laboratory study. *Journal Environmental of Science Health*, 659-673.

- Nousiainen, A. O., Björklöf, K., Sagarkar, S., Nielsen, J. L., Kapley, A., & Jorgensen, K. S. (2015). Bioremediation strategies among *Pseudomonas citronellolis* Strains for removal of residual of contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 1435-1441.
- Paoletti, M. G. (1999). The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 137-155.
- Parthasarathi, K., Ranganathan, L., Anandi, V., & Zeyer, J. (2007). Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. *Journal of Environmental Biology*, 87-97.
- Pettit, G. R., Knight, J. C., Herald, D. L., Pettit, R. K., Hogan, F., Mukku, V. J., . . . Chapuis, J.-C. (2010). Antineoplastic Agents. Isolation and Structure Elucidation of Bacillistatins 1 and 2 from a Marine *Bacillus silvestris*. *NIH Public Acces*, 366-371.
- Pinel, N., KU, K., Bataillon, T., Bendixen, C., D.A, S., & Schramm, A. (2012). Purifying selection and molecular adaptation in the genome of *Verminephrobacter*, the heritable symbiotic bacteria of earthworms. *Genome Biol. Evol.*, 307-315.
- Polyanskaya, L. M., Tiunov, A. V., & Dobrovolskaya, T. G. (2010). Microbial complexes associated with inhabited and abandoned burrows of *Lumbricus terrestris* earthworm in soddy-podzolic soil. *Eurasian Soil Science*, 525-529.
- Reyes, C. I., López, G. N., & Aguirre, J. L. (2008). Evaluación toxicológica con *Eisenia foetida* (Annelida, Lumbricidae). *e-scholarum*, 330-345.
- Reynolds, W. J., & Wetzel, M. J. (2004). Oligochaeta in North America north of México. *Megadrioca*, 71-98.
- Rodicio, M. d., & Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 238-245.
- Rodicio, M. d., & Mendoza, M. d. (2005). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Infectious diseases and clinical microbiology*, 239-244.
- Sanzo, C. d., & Ravera, A. R. (2006). Irrigation frequency on growth of red earthworm (*Eisenia* spp) and vermicompost chemical parameters. Maracaibo, Venezuela: Elsevier.
- Schram, F., & Meglitch, P. (2003). *Invertebrate Zoology*. New Delhi: Oxford University Press.
- Sharp, P., & Wilson, L. A. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology Environmental*, 1156-1168.

- Shuhaimi, M., Ali, A., & Saleh, N. (2005). Utilization of of ERIC based PCR to fingerprint the genomes of Bifidobacterium isolates and other probiotic bacteria. *Molecular Microbiology*, 825-834.
- Singer, A. C., Kumaresan, D., Bodrossy, L., & Murrell, C. (2008). Effect of earthworms in the community structure of active metanotrophic bacteria in an landfill cover soil. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 92-104.
- Singh, A., Dushyant P, S., Rameshwar, T., Kanika, K., Ran Vir, S., Surender, S., . . . Lata, N. (2015). Taxonomic and functional annotation of gut bacterial communities of Eisenia foetida and Perionix excavatus. *Microbiological Research*, 48-56.
- Singh, B., Kaur, J., & Singh, K. (2013). Bioremediation of malathion in soil by mixed Bacillus culture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 674-678.
- Singleton, D. R., Furlong, M. A., Coleman, D., & Whitman, W. B. (2008). Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm Lumbricus rubellus. *Applied and Environmental Microbiology*, 1265-1279.
- Sleigh, M. (2006). Progress in understanding the phylogeny of flagellates. *Tsitologia*, 985-1009.
- Tanner, A., Maiden, M. F., Paster, B. J., & Dewhirst, F. E. (2007). The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Clinical Microbiology Review*, 840-862.
- Tello, E. R. (2013). Conceptos básicos de Filogenética molecular. Tamaulipas.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Finan, D., Egan, D., & Doohan, F. M. (2010). Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *The ISME Journal*, 357-366.
- Tiunov, A. V., & Scheu, S. (2004). Microbial biomass, biovolume and respiration in Lumbricus terrestris. *Soil. Biology. Biochemistry*, 265-375.
- UniProt Consortium. (2002-2015). *UniProt*. Obtenido de <http://www.uniprot.org/taxonomy/6396>
- Villalobos, A. C., & Boschini, C. F. (2009). Earthworm population (Oligochaeta: Annelida) in a dairy farm of the Costa Rican Central Plateau. *Agronomía Mesoamericana*, 91-99.
- Villalobos-Maldonado, J. J., Meza-Gordillo, R., Mancilla-Margalli, N. A., Ayora-Talavera, T. R., Rodríguez-Mendiola, M. A., Arias-Castro, C., . . . Ruiz-Valdiviezo, V. M. (2015). Removal of Decachlorobiphenyl in Vermicomposting Process Amended with Rabbit Manure and Peat Moss. *Water Air Soil Pollut.*
- Villegas, P. T. (Octubre de 2013). Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPC's) por acción del vermicompostaje. *Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPC's) por acción del vermicompostaje*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

- Vinuesa, P. (2007). *BioInfo aplicada a estudios de ecología y sistemática molecular de bacterias*. Brasil .
- Weid, I. v., Alvarez, V., Seldin, L., & Santos, A. (2006). Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology*, 625-630.
- Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution* , 1156-1168.
- Wright, L. (2010). Effects of Acidic pH Levels on Earthworms: Burrowing Behavior. *Anatomy and Physiology*, 114-134.
- Yard, J. (2007). *Eisenia fetida*. California: Uwlax.
- Yurkov, A. M., Chernov, I. Y., & Tiunov, A. V. (2008). Influence of *Lumbricus terrestris* Earthworms on the Structure of the Yeast Community of Forest Litter. *Mikrobiologiya*, 121-125.
- Zhong, L., Xiao-min, L., Yong-tao, L., De-yin, H., Jun, D., & Fang-bai, L. (2012). Enhancement effect of two ecological earthworm species (*Eisenia foetida* and *Amyntas robustus* E.Perrier) on removal and degradation process of soil DDT. *Journal of Environmental Monitoring*, 1551-1558.
- Zhu, H., Bilgin, M., & Snyder, M. (2009). Proteomics. *Annual Review of Biochemistry*, 783-812.
- Zirbes, L., Thonart, P., & Haubruge, E. (2012). Microscale interactions between earthworms and microorganisms: a review. *Biotechnology Agronomy Society Environmental*, 125-131.