



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

EDAFOLOGIA

**“DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL TRACTO
DIGESTIVO DE LA LOMBRIZ DE TIERRA
Pontoscolex corethrurus”**

HORTENSIA BRITO VEGA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO DE MEXICO

2010

La presente tesis, titulada: **Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de la lombriz de tierra: *Pontoscolex corethrurus***, realizada por la alumna: **Hortensia Brito Vega**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____


DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESORA: _____


DRA. ISABELLE BAROIS BOULLARD

ASESOR: _____


DR. ARMANDO GOMEZ VAZQUEZ

ASESOR: _____


DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR: _____


DR. PATRICK LAVELLE

Montecillo, Texcoco, México, Octubre de 2010

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad bacteriana en el contenido digestivo de la lombriz de tierra endógena *Pontoscolex corethrus*. El muestreo de la especie *P. corethrus* se realizó en dos localidades de Veracruz, México: Plan de las Hayas, zona ganadera con suelo arcilloso y La Mancha, zona de reserva ecológica y con suelo arenoso. El intestino de las lombrices fue dividido en cuatro secciones (A, B, C y D). Bajo condiciones asépticas, se prepararon diluciones decimales con el contenido intestinal empleando el medio líquido Brain Heart Infusion. Posteriormente, la suspensión del contenido intestinal se sembró en medios específicos. La identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos puros se realizó por dos procedimientos: 1) pruebas bioquímicas empleando kits de biomérieux API20E[®], API20NE[®] y el software apiweb[™], y 2) la amplificación y secuenciación del gen 16rRNA bacteriano. Se observó que el número de las poblaciones bacterianas aisladas del contenido intestinal de *P. corethrus* presentaron un mismo comportamiento en ambas localidades, aumento en la sección B y disminución de la sección C a la sección D. En Plan de las Hayas fueron identificadas con el sistema API[®] trece especies de bacterias: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *A. salmonicida ssp salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Vibrio parahaemolyticus*. En la Mancha fueron identificadas siete géneros de bacterias en el contenido intestinal de *P. corethrus*: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Shewanella putrefaciens* y *Sphingomonas paucimobilis*. Con el uso de la secuenciación del gen 16S ADNr en las bacterias aisladas del contenido intestinal de *P. corethrus* fueron identificadas siete géneros en Plan de las Hayas (*Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Massilia*, *Aeromonas* y *Citrococcus*) y en la Mancha cuatro géneros de bacterias (*Bacillus*, *Terribacillus*, *Bacterium* y *Aeromonas*). Los resultados obtenidos a través de la secuenciación y alineamiento de la región 16s rARN fueron diferentes a los obtenidos con el sistema API[®]. Se considera que el limitado número de aislamientos de bacterias estudiadas no permitió establecer una clara relación entre las variantes de reacciones enzimáticas con el sistema API[®]. No fue posible realizar pruebas metabólicas adicionales, pero la amplificación del gen 16s ARNr permitió discriminar a nivel de especie y mejorar el diagnóstico bacteriológico. En ambos sitios se observó diferencias filogenéticas y metabólicas en los géneros de las bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrus*. Estas diferencias se pueden deber al tipo de suelo, contenido de C, N y al tipo de ecosistema. Las enzimas catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa y cisteinasa, presentes en las bacterias que son ingeridas junto con el suelo por la lombriz de tierra geófaga, permiten la degradación y/o digestión de la materia orgánica estableciéndose así un mutualismo anisosimbiótico entre bacterias y lombriz (paradigma de la bella durmiente). La interacción entre las bacterias y el intestino de *P. corethrus* contribuye a los servicios de los ecosistemas, al participar directamente en la explotación, degradación, neoformación y reciclaje de los recursos orgánicos y minerales del suelo.

Palabras claves: *anisosimbiosis, lombriz de tierra, enzimas, biodiversidad*

ABSTRACT

The objective of this work was to study the bacterial diversity within the digestive tract of the endogeic earthworm *Pontoscolex corethrus*. Sampling of *P. corethrus* was carried out in two localities in Veracruz, Mexico; “Plan de las Hayas”, a livestock zone with clayey soil and “La Mancha”, an ecological reserve zone with sandy soil. The intestines of the earthworms were divided in four sections (A, B, C, and D). Under aseptic conditions, the intestinal content was diluted with Brain Heart Infusion liquid medium. Subsequently, the diluted suspension containing the intestinal content was grown on plates of specific media. Taxonomic identification of pure bacterial isolates was done by two processes: 1) biochemical test using API20E® and API20NE® biomérieux kits and Apiweb™ software, and 2) the amplification and sequencing of bacterial 16S rRNA gene. It was observed that the bacterial populations isolated from the intestinal content of *P. corethrus* from both localities presented the same behavior: increase in section B and decrease in section C to D. In “Plan de las Hayas” 13 bacterial species were identified with the API® system and are as follows: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *A. salmonicida* sp *salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactru manthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Vibrio parahaemolyticus*. In “La Mancha” nine bacteria species were identified within the intestinal content of *P. corethrus*: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum manthropi*, *Photobacterium damsela*. The sequencing of the 16S rDNA bacterial region showed seven genera from “Plan de las Hayas” (*Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Massilia*, *Aeromonas* and *Citrococcus*) and four from “La Mancha” (*Bacillus*, *Terribacillus*, *Bacterium* y *Aeromonas*). However, the results from API® system were not similar of those obtained from sequencing and alignment of 16S rRNA region. Finally, it was considered that the limited number of bacterial isolations studied did not allow the establishment of a clear relationship among the variants of the enzymatic reactions with the API® system. Additional metabolic tests were not made but the amplification of 16S rRNA permitted the discrimination at species level to improve the bacteriological diagnosis. In both sites, phylogenic and metabolic differences were observed in the bacterial genera isolated from the digestive tract of *P. corethrus*. These differences may be due to soil type, C and N content as well as the ecosystem type. The enzymes catalase, oxidase, gelatinase, citratase, tryptophanase and cysteinase are present in the bacteria which are ingested together with soil by the geophagous earthworm, promote the degradation and transformation of organic matter, establishing in this way an anisymbiotic mutualism (sleeping beauty paradigm). The interaction among the bacteria and the digestive tract of *P. corethrus* contributed to the services of the ecosystems, exploiting and degrading the organic and mineral soil resources.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para el desarrollo de la ciencia.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por la oportunidad de poner en práctica: en el estudio la duda, acción en la fe.

Al Dr. David Espinosa-Victoria por compartir sus conocimientos sobre Filosofía en la Ciencia y la interacción entre las plantas y los microorganismos, por su decidido apoyo en el desarrollo de mi trabajo de investigación, por la gran amistad que cultivamos.

A la Dra. Isabelle Barois Baullard por el apoyo, conocimiento, las observaciones durante la tesis de investigación y la amistad que me brinda.

Al Dr. Patrick Lavallo por ser una guía en esta investigación y por las observaciones pertinentes en la misma.

Al Dr. Armando Gómez-Vázquez por las observaciones a la tesis, por su apoyo y amistad.

A la Dra. Hilda Silva-Rojas por el apoyo, amistad y conocimientos brindados durante la fase de laboratorio.

Al Dr. Mario A. Cobos-Peralta por ser parte de mi Consejo Particular.

A Yolanda Díaz por amistad y apoyo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados.

A mí Familia.

DEDICATORIA

*A MÍ FAMILIA POR EL GRAN AMOR Y APOYO QUE
ME BRINDANRON DURANTE ESTA ETAPA DE VIDA*

*A MÍ GRAN AMOR: QUE ES MÍ HIJA POR SU
ALMA, VIRTUD Y PACIENCIA.*

*A MÍ PADRE: JUVENTINO[†] QUE ME ENSEÑO
A TRABAJAR Y CUMPLIR METAS EN LA
VIDA*

*A MÍ MADRE Y HERMANOS (LEOBARDO, JESÚS, ALEJANDRO, LETICIA,
RAMIRO Y GABRIEL)*

“GRACIAS”

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I		Página
Figura 1.1	Efectos causados por los ingenieros de los ecosistemas en las propiedades físicas del suelo (Lavelle, 1997)	5
Figura 1.2	Efectos causados por las lombrices de tierra en la materia orgánica (MO) del suelo a diferentes niveles de una escala temporal y espacial (Lavelle <i>et al.</i> , 1997)	6
Figura 1.3	Los niveles tróficos de algunos organismos (Sampedro y Domínguez, 2008)	7
Figura 1.4	Sistema mutualista de la digestión de la lombriz de tierra endogea tropical (Barois y Lavelle, 1986)	12
CAPITULO II		
Figure 2.1	Diagram of the digestive system of an earthworm (Horn <i>et al.</i> , 2003)	21
CAPITULO III		
Figura 3.1	El cuerpo de una lombriz de tierra con las secciones del sistema digestivo (Modificada de Horn <i>et al.</i> , 2003)	39
Figura 3.2	(1) Tinción de Gram, (2) MacConkey agar y (3) Movilidad con el medio MIO DIFCO® positivo o negativo de las bacterias aisladas en el contenido intestinal <i>Pontoscolex corethrurus</i>	41
Figura 3.3	La galería de API®NE20: pruebas negativas y positivas de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria	42
Figura 3.4	Frecuencias de las bacterias aisladas en las cuatro secciones en el contenido intestinal <i>P. corethrurus</i> en las localidades de La Mancha y Plan de Las Hayas, Veracruz	51
CAPITULO IV		
Figura 4.1	Sistema mutualista de la digestión de lombriz de tierra endogea tropical (Barois y Lavelle, 1986)	62
Figura 4.2	Productos de amplificación del gen 16S rARN de bacterias aisladas en el contenido intestinal de la lombriz de tierra <i>Pontoscolex corethrurus</i> 1-34, aislamiento bacteriano; X, control, M, marcador de peso molecular 1kb	66
Figura 4.3	Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra <i>P. corethrurus</i> , construido con las secuencias parciales de gen16S rARN amplificado por PCR	72
Figura 4.4	Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra <i>P. corethrurus</i> de la zona de La Mancha, construido con las secuencias parciales de gen16S rARN amplificado por PCR	73
Figura 4.5	Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra <i>P. corethrurus</i> de la zona de Plan de las Hayas, construido con las secuencias parciales de gen16S rADN amplificado por PCR.	74

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
CAPITULO I		
Cuadro 1.1	Contribución de los invertebrados del suelo en los bienes y servicios de los ecosistemas del suelo (Lavelle <i>et al.</i> , 2006)	4
CAPITULO II		
Table 2.1	Ecological category of earthworm species under different agricultural systems in Mexico	20
Table 2.2	Microbial presence within the intestine of different species of earthworms	24
Table 2.3	Bacterial identified within the intestinal walls of earthworms	26
Table 2.4	Molecular techniques used to study of bacterial diversity within the digestive tract of earthworms	28
CAPITULO III		
Cuadro 3.1	Características generales de los dos sitios de muestreo, La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz (Barois <i>et al.</i> 1999; Barois 1987)	38
Cuadro 3.2	Tests de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria de las galerías API [®] NE20 y E20 BioMerieux [®]	43
Cuadro 3.3	Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las bacterias aisladas, de las secciones del contenido intestinal <i>P. corethrurus</i> , en las zonas La Mancha y Plan de Las Hayas, Veracruz	45
Cuadro 3.4	Características morfológicas y reacciones enzimáticas de las bacterias aisladas del contenido intestinal <i>P. corethrurus</i> .	47
Cuadro 3.5	Frecuencia de las bacterias aisladas en el contenido intestinal <i>P. corethrurus</i> en La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz	53
CAPITULO IV		
Cuadro 4.1	Características generales de los dos sitios de muestreo, La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz (Barois <i>et al.</i> 1999; Barois 1987)	62
Cuadro 4.2	Alineamiento de las bases nucleotídicas de las secuencias parciales del Gen 16S rARN de los aislamientos bacterianos del contenido intestinal de <i>P. corethrurus</i> en el GenBank	68
Cuadro 4.2	Frecuencia de las bacterias aisladas del contenido intestinal <i>P. corethrurus</i> en La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz	69

CONTENIDO

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Índice de Figuras	v
Índice de Cuadros	vi
CAPITULO I	1
ESTADO DEL ARTE	
La lombriz de tierra en la anisosimbiosis con las bacterias y su participación en los servicios del ecosistema	
Introducción	1
Importancia de la lombriz de tierra en los servicios de los ecosistemas	2
Formación del suelo	3
Producción	3
Materia orgánica (MO)	7
Morfología de la lombriz de tierra	8
Aparato digestivo y excretor	9
Taxonomía de la lombriz de tierra	10
Diversidad y biomasa de lombriz	10
El paradigma de la Bella durmiente	11
Enzimas que intervienen en el metabolismo a nivel celular entre lombriz de tierra-bacterias	13
<i>Pontoscolex corethrurus</i>	15
Objetivo general	16
Hipótesis	16
Objetivos particulares	16

CAPITULO II

BACTERIAL DIVERSITY IN THE DIGESTIVE TRACT OF EARTHWORM (OLIGOCHAETA)

Abstract	17
Introduction	18
Taxonomy and ecology of earthworm	18
Diversity of soil bacteria	22
Microbial diversity within the digestive within the digestive tracts of earthworm	23
Bacterial diversity in the digestive tract of earthworm	25
Molecular techniques used in the study of bacterial diversity within the digestive tracts of earthworms	27
Conclusions	29
Acknowledgements	30
References	30

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN BACTERIANA EN EL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LOMBRIZ DE TIERRA *Pontoscolex corethrurus*

	35
Resumen	
Introducción	36
Materiales y métodos	38
Sitio de colecta	38
La caracterización de la microflora intestinal	38
Fijación de la lombriz de tierra	39
Unidades formadoras de colonias y aislamiento de bacterias	39
Morfología de las bacterias	41
Metabolismo e identificación fenotípica de las bacterias	42
Las frecuencias de las bacterias	42
Resultados y discusión	44
Unidades formadoras de colonias (UFC)	44
Características morfológicas y reacciones enzimáticas de las bacterias	46

Frecuencia de las bacterias aisladas del contenido intestinal <i>P. corethrurus</i>	50
Conclusión	54
Agradecimiento	55
Referencias	56

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LOMBRIZ DE TIERRA: *Pontoscolex corethrurus*

Resumen	59
Introducción	60
Materiales y métodos	61
Sitio de colecta	62
Fijación de la lombriz de tierra	62
Aislamiento y purificación	63
ADN bacteriano	63
Amplificación del gen 16 S rARN	64
Secuencia de ADN	65
Análisis filogenético	65
Frecuencias de las bacterias	65
Resultados y discusión	65
Amplificación del gen 16s rARN	65
Análisis de las secuencias parciales del gen 16s rADN	66
Alineamiento de las secuencias	66
Frecuencia de las bacterias aisladas de <i>P. corethrurus</i>	67
Construcción de dendrograma	70
Conclusión	74
Agradecimiento	75
Referencias	75
Conclusión final	77
Referencias	79

ANEXO A
ANEXO B

82
87

CAPITULO I

ESTADO DEL ARTE

La lombriz de tierra en la anisosimbiosis con las bacterias y su participación en los servicios del ecosistema

Introducción

El uso intensivo de la tierra y una inadecuada práctica de manejo producen una disminución de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos. Las técnicas convencionales de laboreo aumentan la velocidad de degradación de los residuos vegetales y produce un aumento en la mineralización de la materia orgánica del suelo. El componente biológico del suelo es fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas (Barois y Brown, 2000). La parte biológica del suelo está clasificada por su tamaño: macro, meso y micro-organismos. Entre las actividades microbianas, realizadas por millares de seres microscópicos (bacterias, hongos y actinomicetos), cabe destacar ciertas reacciones químicas y procesos físicos (descomposición, humificación, regulación y ciclaje de los nutrientes y denitrificación) producidos por acciones metabólicas, las cuales son claves para el crecimiento vegetal y el mejoramiento de la estructura del suelo (Azcon, 2001). Entre los macroinvertebrados del suelo, organismos cuyo ancho es > 2 mm, se encuentra, la lombriz de tierra que interviene, promueve o regula en distintos procesos físicos, químicos y biológicos: la agregación y estructura del suelo, la textura y consistencia del suelo, el movimiento e infiltración del agua, el intercambio gaseoso y las propiedades químicas y nutricionales del mismo (Lavelle y Spain, 2001). Las raíces, los invertebrados y la microbiota del suelo han desarrollado interacciones para explotar los recursos orgánicos y minerales del suelo inaccesibilidad (Lavelle *et al.*, 1995).

Las lombrices de tierra, suelen encontrarse en los suelos profundos, y húmedos permeables, son participantes como reductores de la materia orgánica, , lo que a su vez favorece una mejor mezcla de las fracciones orgánica, mineral, y la fertilidad del suelo;

intervienen en la aireación e infiltración del agua en el suelo por medio de galerías proporcionan materia orgánica disponible para otros organismos y participan en la formación de agregados del suelo mediante la producción del turrículo, y también interactúan con los microorganismos del suelo (Lavelle, 1988; Barois, 1992; Brown *et al.*, 2000). Aun no se conoce bien de que se nutren las lombrices y no se ha determinado en la mayoría de lombrices de tierra que posean enzimas para digerir directamente la celulosa, la lignina, los taninos y los complejos húmicos en cambio. Sin embargo, estas enzimas están presentes o son producidas por los microorganismos del suelo principalmente por las bacterias y estos microorganismos son ingeridos por los invertebrados del suelo, los cuales degradan los compuestos complejos orgánicos del suelo gracias las enzimas, volviendo asimilable la materia orgánica para las lombrices microbianas (Lattaud *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 2003). Así, entre la lombriz de tierra geófaga y la microflora se establece una interacción mutualista de tipo anisimbiótica (diferente tamaño de los interactuantes), para descomponer el material orgánico ingerido por la lombriz de tierra (Lavelle *et al.*, 1995). Varios trabajos se han hecho en el sentido de probar estas interacciones observando la actividad microbiana, los organismos que se encuentran dentro del contenido intestinal y sus actividades, esto con diferentes técnicas, pero la mayoría de estos estudios se han hecho en lombrices de tierra de regiones templadas y los hechos con las lombrices tropicales no han mostrado que bacterias se encuentran y son las responsables de estas actividades. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar la diversidad de bacterias que se encuentran en el contenido intestinal de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus* para explotar los recursos orgánicos y minerales del suelo tanto del punto de vista, enzimológico como molecular.

Importancia de la lombriz de tierra en los servicios de los ecosistemas

Las lombrices de tierra participan ampliamente en la regulación de los procesos y la entrega de los servicios del ecosistemas (Cuadro 1.1) (Lavelle *et al.*, 2006). Lo que Darwin ya había observado y utilizó las lombrices de tierra para incrementar la fertilidad de los terrenos agrícolas de forma directa (Lavelle, 1988).

Formación del suelo

La lombriz de tierra participa en los servicios de los ecosistemas tales como la formación del suelo, regularización y suministro del agua por su actividad mecánica dentro del suelo dada su capacidad de moverse, creación de estructuras que afecta la aireación y la infiltración del agua (e.g., galerías), la degradación de la materia orgánica y su mezcla en el suelo, parte de esta degradación se debe a la digestión que se efectúa en su tracto digestivo y el resultado final la producción de excretas que forman parte de las estructuras biogénicas, por lo que también se les denomina ingenieros del ecosistema (Figura 1.1; Brown *et al.*, 2000; Lavelle *et al.*, 2006).

Producción

Las lombrices de tierra proporcionan un servicio de producción al ecosistema al digerir la materia orgánica mediante su interacción con la microflora mutualista que se encuentra en su tracto digestivo. Los efectos causados por las lombrices pueden observarse a diferentes escalas de tiempo y espacial (Figura 1.2). 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 (Barois, 1987; Lavelle *et al.*, 1992; Lavelle *et al.*, 1997).

Por ello las lombrices de tierra afectan el ciclo de nitrógeno directamente al consumir, asimilar N-orgánico y mineralizarlo. Las lombrices pueden procesar grandes cantidades de materia orgánica, el rango de consumo de *Aporrectodea tuberculata* va de 5 a 13 mg material orgánico g⁻¹ lombriz día⁻¹; mientras que para *Lumbricus terrestris* va de 14 a 2.7 mg g⁻¹ día⁻¹. La eficiencia del nitrógeno asimilado (¹⁵N) asimilado va de 10 a 26 % en *A. tuberculata* y de 25-30 % en *L. terrestris*. Whalen y Parmelee, (1999) estima que el consumo por las lombrices de tierra puede ser 11.8 a 17.1 Mg materia orgánica ha⁻¹ año⁻¹, esto puede equivaler de 19-24 % de los residuos de la materia orgánica de las cosechas. Las lombrices geófagas pueden ingerir cantidades enormes de suelo, La población de *Pontoscolex corethrurus* de los pastizales de Plan de las Hayas Veracruz puede ingerir de 400 Mg por ha por año, lo que equivale a que una lombriz de esta puede ingerir de 1 a 3 veces su propio peso al día (Lavelle *et al.* 1987).

Cuadro 1.1. Contribución de los invertebrados del suelo en los bienes y servicios de los ecosistemas del suelo (Lavelle *et al.*, 2006).

Función de servicios	Bienes/servicios	Procesos del ecosistema	Contribución de los invertebrados del suelo	Indicador de contribución de la fauna
Producción	Suministro del agua	Infiltración y sistema de almacenamiento de agua en los poros del suelo	Mantenimiento de los poros por medios de túneles y madrigueras	Proporción y arreglo de las estructuras biogénicas en el suelo, la capacidad de agua y la descomposición de la materia orgánica
Soporte	Ciclo de nutrientes	Descomposición Humificación Regulación de los nutrientes (Denitrificación)	Selección/ activación de la actividad microbiana	Descomposición de la hojarasca El perfil de la materia orgánica, contenido y fracciones en el suelo
	Formación del suelo	Pedogénesis	Bioturbación Deposición superficial Selección de partículas	Análisis de la estructura biogénica del DNA y NIRS
	Producción primaria	Estimulación de la actividad simbiótica en el suelo Producción indirecta en el suelo de las moléculas reconocidas por las plantas como hormonas Protección contra parásitos y enfermedades	Enlace selectivo de los dominios funcionales Control de parásitos a través interacciones biológicas; capacidad realzada de la respuesta de la planta	Morfología del suelo y del humus Gravemente DNA del suelo Comunidades de la fauna del suelo Índices de vigor en plantas
Regulación	Control de la erosión e inundación	Regulación de la salida del agua	Creación de la aspereza superficial por las estructuras biogénicas	Producción de estructuras biogénicas
	Regulación climática	Infiltración y almacenaje de agua Producción de los gases invernaderos Almacenamiento de la materia orgánica	Construcción y mantenimiento de la estabilidad de la porosidad y bioturbación de los turriculos Secuestro de la materia orgánica Secuestro de la materia orgánica inestable macroagregados biogénicos Formación de enlaces resistencia de compuestos húmicos	Morfología del suelo y humus Estabilidad de macro-agregados biogénicos

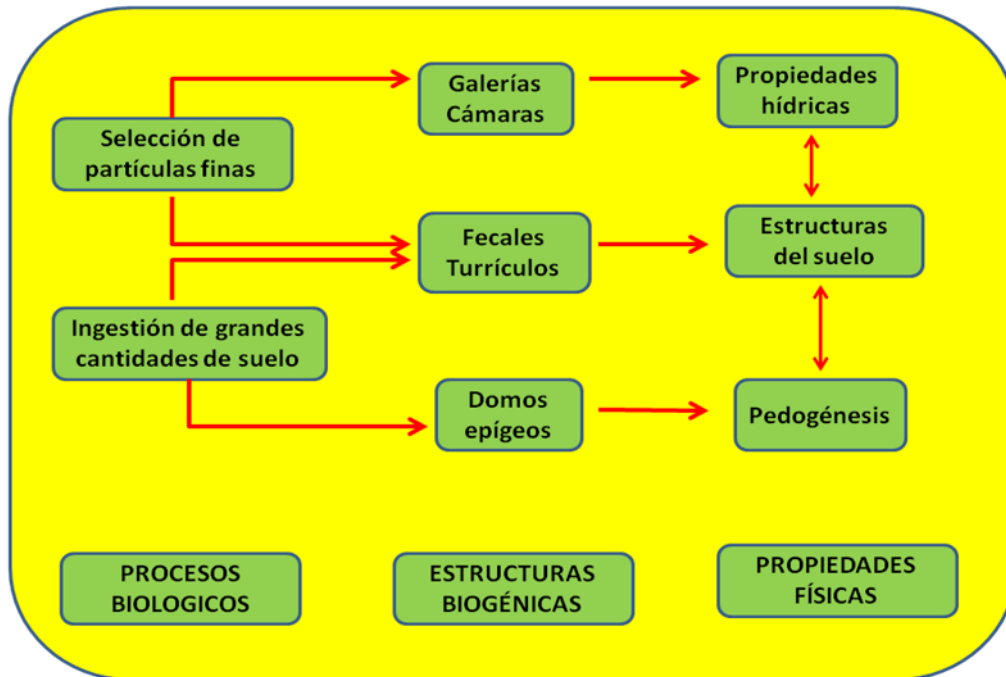


Figura 1.1. Efectos causados por los ingenieros de los ecosistemas en las propiedades físicas del suelo (Lavelle, 1997).

Existen tres grupos funcionales de lombrices que por su hábitat y alimentación contribuyen de una manera u otra a los servicios ecosistémicos: las epigeas (habitantes de la hojarasca, consumidoras de materia orgánica en descomposición, dorsoventralmente aplanadas y pigmentadas), las endogeas (habitantes del suelo, no pigmentadas, consumidoras de tierra, y subdivididas en poli, meso y oligohúmicas, (Lavelle, 1983) y las anecicas (habitantes del suelo y consumidoras de hojas) formadoras de galerías (Brown *et al.* 2000). Estos comportamientos conducen generalmente a una estimulación del crecimiento vegetal (Whalen y Parmelee, 1999; Hallaire *et al.*, 2000; Eriksen-Hamel y Whalen, 2007). Por ejemplo, Eriksen-Hamel y Whalen (2007) analizaron dos especies de lombrices, una endogea *Aporrectodea caliginosa* que fue dominante en el campo y una anécica *Lumbricus terrestris* que apenas sobrevivió a las condiciones del campo en un cultivo y observaron que el N-total en el grano de soya se incrementó 25 % con el aumento de la población de lombrices de tierra (100 a 500 individuos m⁻²).



Figura 1.2. Efectos causados por las lombrices de tierra en la materia orgánica (MO) del suelo a diferentes niveles de una escala temporal y espacial (Lavelle et al, 1997).

Materia orgánica (MO)

La materia orgánica del suelo esta constituida de componentes de muy diversa índole y estado de descomposición, puede variar en función de la calidad de material, en la mineralización (azucares, aminoácidos, hemicelulosa, celulosa, y lignina) y la humificación. En el proceso de la descomposición de la MO se ve favorecida por la participación de los organismos del suelo (micro y macroorganismos) que ingieren y transforman una mezcla de sustratos orgánicos e inorgánicos del suelo. Al terminó de este proceso, parte del producto final puede ser asimilado por las raíces u otros organismos. Los organismos participan a diferentes niveles del sistema trófico, entre ellos las lombrices de tierra que participaron favorablemente en los cambios de N del mantillo (Figura 1.3), algunos se alimentan de microbios (microbívoros), de materia orgánica en descomposición (detritívoros), o la mezcla de microbívoros-detritívoros (Domínguez *et al.*, 2009). Se desconoce aun en que nivel trófico debe ubicarse a las lombrices de tierra, ya que pueden utilizar diferentes estrategias de alimentación, desde mecanismos selectivos y no selectivos, además de que tienen la capacidad de obtener energía tanto de fuentes de carbono vivas como muertas (Domínguez *et al.*, 2003; Aira *et al.*, 2008; Sampedro y Domínguez, 2008).

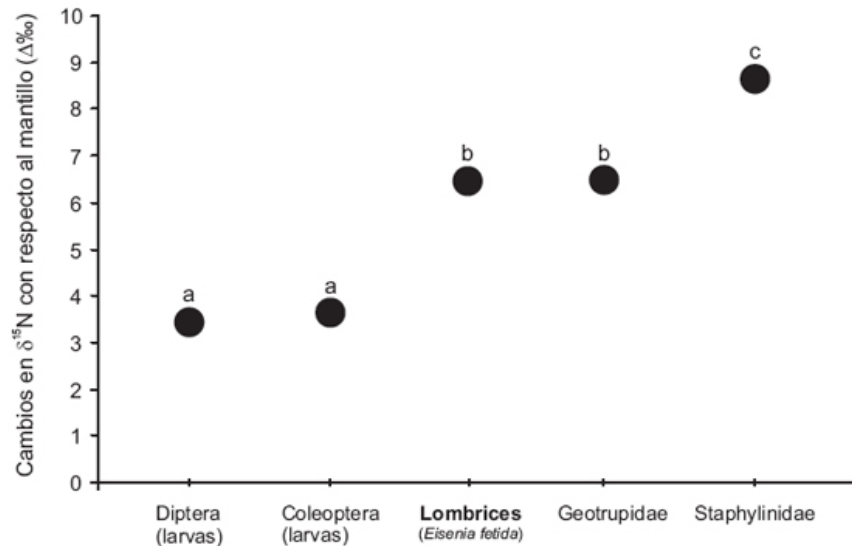


Figura 1.3. Los niveles tróficos de algunos organismos (Sampedro y Domínguez, 2008). Letras a, b y c significan diferencia estadísticas.

La Materia orgánica y su descomposición

La descomposición de la materia orgánica se realiza en dos fases diferentes en relación a la actividad de las lombrices de tierra: 1) fase activa, donde las lombrices procesan la materia orgánica, modifican las propiedades físicas, químicas y la composición microbiana (Lores *et al.*, 2006); y 2) la fase de maduración, donde los microorganismos asumen el control en la descomposición del material orgánico previamente procesado por las lombrices (Domínguez, 2004).

Las lombrices de tierra participan en la descomposición, transformación y mineralización de la materia orgánica a través de procesos que se dan en su sistema digestivo. Los procesos incluyen la modificación de la actividad y la diversidad microbiana, la modificación de las poblaciones de la microfauna, la homogenización del sustrato y los procesos intrínsecos de digestión y asimilación; incluyen también la producción de moco, que constituyen una fuente de nutrientes fácilmente asimilables para los microorganismos. Estos microbios producen enzimas extracelulares que degradan celulosa y distintos compuestos fenólicos, aumentando la degradación del material ingerido (Domínguez *et al.*, 2009).

La mineralización de nutrientes se realiza por la actividad metabólica de bacterias y hongos. Pero esta actividad metabólica está influenciada por la fauna del suelo que convive con los microorganismos, y también por distintas interacciones que determinan la transferencia de nutrientes a través del sistema. En este sentido, las deyecciones de las lombrices de tierra juegan un papel importante en la descomposición porque contienen nutrientes y microorganismos que son diferentes a los contenidos en el material orgánico antes de la ingestión (Domínguez *et al.*, 2009).

Morfología de las lombrices de tierra

La forma general del cuerpo es casi cilíndrica. Como en el resto de los anélidos, el cuerpo está dividido en segmentos, y posee tres regiones: 1) Prostomio o región cefálica, que, a diferencia de los poliquetos, carece de apéndices. 2) Tronco o región mediana, constituido por metámeros homónomos, que en número que oscila entre 7 y 600 (Edwards y Lofty, 1977), salvo raras excepciones, presentan cuatro pares de quetas por metámero, siempre menos numerosas que en los poliquetos, las quetas anclan al animal en el desplazamiento y en la excavación de túneles y 3) pigidio, donde se abre el ano (Rota y Omedeo, 1992).

Ciertas especies poseen quetas sexuales, más largas, actúan como órganos en la inseminación. La mayoría de los oligoquetos poseen en el dorso unos poros que conectan con el celoma por donde expulsan sustancias de carácter defensivo, provista de antibióticos (Horn *et al.*, 2003). Una formación muy evidente en los oligoquetos es el clitelo. Se trata de una zona glandular con segmentos en forma de silla de montar (Edwards y Lofty, 1977).

El clitelo aparece en el momento de la madurez sexual y es el responsable de la formación del capullo donde se desarrollarán los huevos, y de la formación del cilindro mucoso que sirve para la cópula (Righi, 1992). El clitelo y sus anexos son de gran importancia en la sistemática del grupo. La cavidad general, llamada celoma, está llena de fluido en la cual están suspendidos el intestino y otros órganos. Los oligoquetos

tienen típicamente un celoma espacioso que es usado como hidroesqueleto. El celoma está dividido en segmentos mediante tabiques transversales. El celoma comunica con el exterior por los poros dorsales y por los poros excretores de los nefridios situados en la región lateroventral.

Cada tabique separa un segmento del cuerpo, que incluye una porción de los sistemas nervioso y circulatorio, permitiendo que funcione de manera relativamente independiente; cada uno de estos segmentos se denomina metámero. Cada metámero está marcado externamente por uno o más anillos. Cada metámero tiene una capa externa (una delgada cutícula y epidermis con abundantes células productoras de moco) y, por debajo, una capa de músculo circular sobre una de músculos longitudinales, que son las responsables de los movimientos peristálticos con que se desplaza el animal (Edwards y Lofty, 1977).

Aparato digestivo y excretor

El aparato digestivo se inicia en la boca, que puede ser evertible, a la cual sigue la faringe, abundante en fibras musculares, capaz de producir una gran succión, que es la forma de alimentación típica de las lombrices de tierra (Edwards y Lofty, 1977). A continuación se encuentra el estómago (formado por buche y molleja), el intestino el recto y el ano. El intestino posee un surco mediano dorsal denominado tiflosolio que incrementa la superficie de absorción (Edwards y Lofty, 1977). La mayoría de oligoquetos se alimentan de materia orgánica en descomposición, hojas, animales muertos y vegetación (Viljoen *et al.*, 1992), aunque como se mencionó anteriormente las lombrices anecicas y endogeas ingieren suelo mineral en particular las endogeas ingieren 100% suelo y se les dice que son geófagas pero en ese suelo hay materia orgánica amorfa (humus) que es la que nutre las lombrices.

En la superficie externa del intestino, y rodeando el vaso sanguíneo dorsal, se encuentra el llamado tejido cloragógeno, propio de los oligoquetos. Éste se encuentra constituido por células peritoneales modificadas (células cloragógenas), y cumple una función análoga a la que realiza el hígado en otros grupos animales, a saber, sintetiza y almacena glucógeno y grasas, y excretan urea (Horns *et al.*, 2003).

Taxonomía de las lombrices de tierra

La clasificación taxonómica de las lombrices de tierra terrestres es la siguiente pertenecen al reino: Animalia, phylum: Annelida, y clase: Clitellata, uno de los ordenes es : Haplotaxida, y suborden: Lumbricina, y las familias son: Acanthodrilidae, Ailoscolidae, Alluroididae, Almidae, Criodrilidae, Eudrilidae, Exxidae, Glossoscolecidae, Hormogastridae, Lumbricidae, Lutodrilidae, Megascolecidae, Microchaetidae, Ocnerodrilidae, Octochaetidae y Sparganophilidae (Reynolds, 1998; Pop, 1998; Fragoso, 2001).

Se han descrito más de 3,000 especies de lombrices de tierra, pero se estima a 7000 el número posible de especies y la gran mayoría sólo se conoce el nombre y su morfología, no existe información suficiente sobre su biología y ecología. Las distintas especies de lombrices tienen estrategias vitales diferentes, ocupan nichos ecológicos distintos y se han clasificado, sobre la base de su alimentación y de la zona del suelo en la que viven: epigeas, anécicas y endogeas como se mencionó anteriormente (Lavelle *et al.*, 1997). En México se han descrito 93 especies de lombrices de tierra, de las cuales 46 son nativas exóticas, que pertenecen a las familias Megascolecidae, Acanthodrilidae y Glossoscolecidae (Fragoso, 2001).

Diversidad y biomasa de lombrices

En los ecosistemas naturales, como selvas, se registran la mayor cobertura y diversidad vegetal así como la mayor diversidad de lombrices. En cambio, la diversidad es menor en los ecosistemas manejados como agroecosistemas de monocultivos no arbóreos, monocultivo arbóreos, policultivos y pastizales inducidos, (Huerta *et al.*, 2005). En un agrosistema cañero en Veracruz, las lombrices de tierra presentaron 82 % la biomasa total de la macrofauna. Es importante resaltar ausencia de quemas en cada cosecha, presencia de una espesa capa de hojarasca y una gran cantidad de materia orgánica en el suelo en el sitio evaluado (Brown *et al.*, 2000).

En promedio, la biomasa total de la macrofauna en agroecosistemas es de 5.1 g m^{-2} , mientras que en los bosque y las sabanas, la biomasa es cuatro y siete veces mayor, respectivamente. En el estudio de la diversidad en los ecosistemas tropicales se observa que las plantaciones de árboles, los cultivos arbóreos, los cultivos y los acahuales alcanzan 38 g m^{-2} de la biomasa de la macrofauna, mientras que en los pastizales aumenta conspicuamente, llega 73.2 g m^{-2} . En ambos casos el aumento de la biomasa fue debido principalmente a las lombrices de tierra, que representaron más del 90 % de la biomasa total. Las condiciones edáficas crean con cierta frecuencia patrones de distribución horizontal en forma de manchones de vegetación o de recursos más abundantes, que se reflejan en la distribución de la fauna y que a menudo no son tomados en cuenta por el método del transecto lineal (Brown *et al.*, 2000).

Las lombrices representaron del 10 al 40 % de la biomasa de los macroinvertebrados en los ecosistemas; mientras que en los agroecosistemas, las lombrices representaron del 60 al 80 %. Los oligoquetos están presentes mayormente en las selvas y en los sistemas manejados en los arbóreos, estos macroorganismos pueden ser indicadores de la calidad del suelo con su presencia o ausencia como lo mostró en el estado de Tabasco, México, Huerta *et al.*, (2008).

El paradigma de la Bella durmiente

Los microorganismos pueden realizar casi cualquier transformación química, durante la descomposición del material orgánico, y su actividad es altamente dependiente de la influencia de los macro-organismos, los cuales son influídos por el ambiente a escalas grandes del tiempo y espacio (Lavelle *et al.*, 1995). Los organismos tienen dificultades dentro del suelo, ya que es un medio difícil de habitar por: (1), la dificultad de moverse en un ambiente compacto debido al tamaño de los poros y la distribución discontinua del aire y agua, (2) las condiciones microclimáticas desfavorables ocasionalmente como la sequía, la inundación o helada y (3) la calidad de los recursos naturales como la baja calidad de hojas, las raíces de las plantas, y las reservas húmicas (Lavelle *et al.*, 1995).

Parece que la lombriz de tierra no posee enzimas para digerir directamente la celulosa, lignina, taninos y complejos húmicos, en cambio estas enzimas están presentes en los microorganismos. Estos microorganismos son ingeridos por los invertebrados, realizando una anisimbiosis, para así degradar los compuestos complejos por medio de las enzimas (Figura 1.4) (Lavelle *et al.*, 1995; Lattaud *et al.*, 1998).

Los microorganismos encuentran en la parte anterior del sistema digestivo de la lombriz de tierra, condiciones favorables para su desarrollo tales como: un alto contenido de agua (100 a 150 % peso seco de suelo), pH neutral, altas concentraciones del moco intestinal (5 a 18 % peso seco del suelo ingerido, dependiendo de la especie), y material orgánico fácilmente asimilable por la lombriz (Barois y Lavelle, 1986; Barois, 1992).

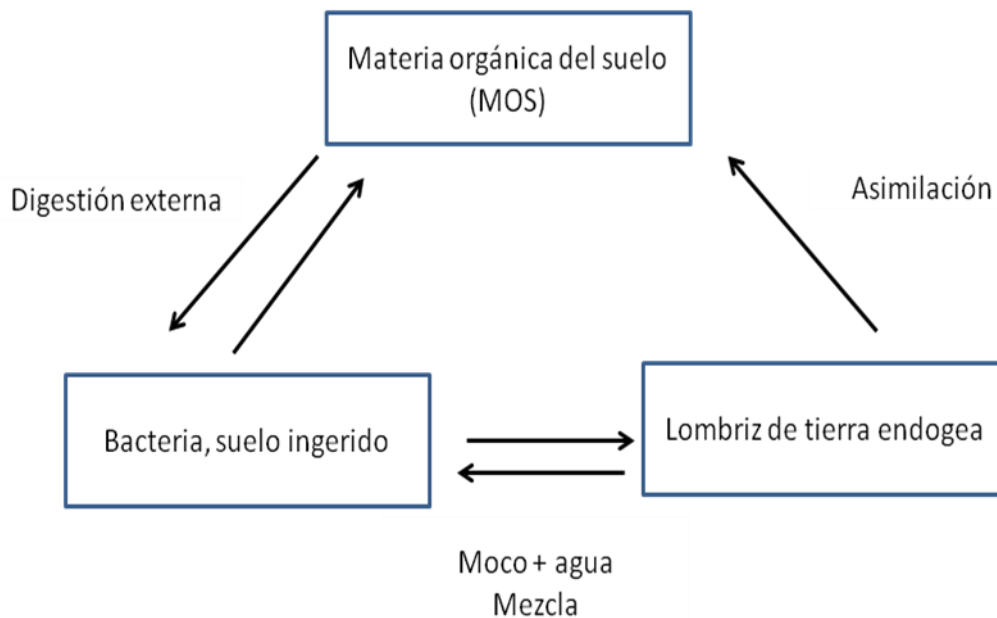


Figura 1.4. Sistema mutualista de la digestión de la lombriz de tierra endógena tropical (Barois y Lavelle, 1986).

Barois (1987), Lavelle *et al.*, (1995) y Lattaud *et al.*, (1998) indican que los microorganismos provienen del suelo ingerido, pero también se dice que algunos pertenecen al intestino de las lombrices de tierra y, participan en la degradación de compuestos complejos por medio de las enzimas que poseen. Algunos

microorganismos que se encuentran en la parte anterior del sistema digestivo de la lombriz de tierra, son favorecidos con ciertas condiciones para su desarrollo como: un alto contenido de agua (100 a 150% peso seco de suelo), pH neutral y sobretodo, altas concentraciones del moco intestinal (5 a 18% peso seco del suelo ingerido, dependiendo de la especie) que es un material orgánico fácilmente asimilable que permite desencadenar la actividad microbina. Lavelle *et al.*, (1995) menciona que la capacidad de la microflora para moverse dentro del suelo son limitados y no pueden utilizar los recursos orgánicos que están cerca. Por lo tanto, los microorganismos están inactivados para participar en la hidrólisis o degradación del sustrato orgánico, hasta que se presenten las condiciones favorables.

Enzimas que intervienen en el metabolismo a nivel celular entre lombriz de tierra-bacterias

La gran mayoría de los invertebrados del suelo no parece poseer enzimas (proteasa, celulosa, mannanasa, fosfomonesterasa, xilanas, etc.), para actuar directamente en la hidrólisis de la celulosa, lignina, taninos y algunos complejos húmicos. Las enzimas presentes en los microorganismos, contribuyen en la degradación de estos compuestos en el tracto digestivo de las lombrices de tierra (Lavelle *et al.*, 1995; Lattaud *et al.*, 1998; Merino-Trigo *et al.*, 1999; Flegel y Schrade, 2000). Las secreciones exocrinas producidas por la lombriz de tierra consisten en las mezclas acuosas de agua, iones, enzimas y mucus (Barois, 1992; Lattaud *et al.*, 1998).

Las bacterias metabolizan el material orgánico degradado en el sistema digestivo de la lombriz de tierra, por medio de las enzimas que son específicas en el sustrato: las proteasas catabolizan las proteínas, la amilasa hidroliza el almidón; la xilanas degrada el material vegetal (el xilano) y la celulasas rompen los enlaces de la celulosa. Las enzimas influyen en la liberación específica de nutrientes y en la calidad del alimento para ser asimilado en el cuerpo de la lombriz (Lavelle *et al.*, 1995; Flack y Hartenstein, 1984; Lattaud *et al.*, 1998; Merino-Trigo *et al.*, 1999; Flegel y Schrade, 2000).

Zhang *et al.*, (2000) estudiaron algunas moléculas que son producidas en la descomposición orgánica en el sistema digestivo de *Metaphire guillelmi* y *Eisenia fetida*, tales como azúcar, proteínas, así como las actividades de las enzimas celulasa, proteasa, fosfatasas y la hemicelulasa. Estas son sustancias que permanecen en los residuos parcialmente hidrolizados, son principalmente celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias sintetizadas nuevamente por los microorganismos y células microbianas.

Saavedra *et al.*, (2006) analizaron la biogradación de compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* y *Eisenia foetida* en desechos orgánicos de una industria de aceite de oliva. Ambas especies el hongo y la lombriz redujeron alrededor de 90 % de compuestos fenólicos a través de la actividad de las enzimas lacasa y peroxidasa. Además se detectó incremento en la actividad de la deshidrogenasa y la β -glucosidasa, por lo que se puede indicar que responsables también de la oxidación de compuestos fenólicos, carbón orgánico y ácido húmicos; así como del incremento en el contenido de nitrógeno y fósforo durante la degradación de la basura industrial.

Las enzimas pueden considerarse útiles para monitorear cambios en las actividades bacterianas y establecer categorías según su función: hidrolasas (fosfatasas, proteasas y ureasas), oxidorreductasas (deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas), amilasas, liasas y transferasas (Malcolm *et al.*, 2000; Eivazi y Tabatabai, 1977). La actividad proteasa es la responsable de la descomposición progresiva del nitrógeno (N) en las proteínas a N peptídico y, finalmente, a N de aminoácidos. La enzima proteasa consiste siempre en la hidrólisis del enlace peptídico que se encuentra en el suelo y algunas bacterias (Khosravi *et al.*, 2008). La catalasa es una enzima intracelular que se encuentra en todas las bacterias aerobias y en la mayoría de las anaerobias facultativas, estando ausente en las anaerobias obligadas. Por ello, esta enzima se ha venido considerando a lo largo de los años como un exponente de la actividad microbiana del suelo y se ha relacionado con el estado de fertilidad edáfico (Guwy *et al.*, 1999). Sin embargo, otras reacciones enzimáticas como las hidrolasas, implicadas en los ciclos de los elementos nutritivos como es el caso de las carbohidrasas, quitinasas, β -glucosidasa implicadas en el ciclo del carbono, las fosfatasa en el ciclo del fósforo,

ureasa y proteasa ciclo del nitrógeno y la arilsulfatasa en el ciclo del azufre, son consideradas como parámetros específicos porque corresponden a reacciones concretas (Nannipieri *et al.*, 1990).

Pontoscolex corethrurus

La lombriz de tierra *P. corethrurus* Müller es una especie peregrina, exótica endógena y geófaga, de la familia Glossoscolecidae originaria de la parte norte de América del Sur. Se trata de una especie de crecimiento rápido (tres meses) y reproducción partenogenética obligatoria, con una longitud máxima de 14 cm, que puede alcanzar una abundancia de más de 500 ind/m² y una biomasa de casi 100 g/m² (Lavelle *et al.*, 1987; Fragoso, 2001). Fragoso (2001) señala que esta especie: i) se encuentra en 56 países de los 5 continentes, ii) se distribuye en un rango altitudinal de 0 a 2000 msnm, iii) presenta una alta plasticidad ecológica a factores macro (precipitación, temperatura) y microambientales (pH, y materia orgánica), iv) es común tanto en ambientes no perturbados (42 % de los registros) como perturbados (58 % de los registros), y v) es más frecuente en pastizales y plantaciones de árboles (20 % de los registros en cada ambiente).

Barois (1987) estudió el moco secretado por *P. corethrurus*, observando que en la parte anterior del sistema digestivo las concentraciones son las más altas y en la posterior el moco casi no está presente, debido posiblemente a que parte de éste es metabolizado por los microorganismos y la otra es reabsorbida y reciclada en la lombriz. Barois (1987) y Lavelle *et al.*, (1997) demostraron que el sistema mutualista de la digestión en la lombriz de tierra así como la microflora, se incrementan cuando hay aumento de la temperatura (15° C a 27° C); pero poco se sabe sobre la identidad de las bacterias o procariontes que son incorporados junto con el suelo al sistema digestivo de *P. corethrurus*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad bacteriana del tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethurus* y probar la presencia del paradigma de la bella durmiente, en las localidades del Plan de las Hayas y La Mancha, Veracruz.

HIPOTESIS

La lombriz de tierra *Pontoscolex corethurus* en el tracto digestivo presenta una gran diversidad de bacterias para explotar los recursos orgánicos y minerales del suelo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar y caracterizar morfológicamente y bioquímicamente a las bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethurus*.
2. Diferenciar genéticamente a las bacterias que habitan el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethurus*.

CAPITULO II

JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES 9 (3):192-199, 2009 ISSN 1727-3048

©2009 ASIAN NETWORK FOR SCIENTIFIC INFORMATION

BACTERIAL DIVERSITY IN THE DIGESTIVE TRACT OF EARTHWORMS (OLIGOCHAETA)

Hortensia Brito-Vega^{*1} and David Espinosa-Victoria²

¹Universidad Juarez Autonoma de Tabasco-Division Academica de Ciencias Agropecuarias. Km 25.5
Villahermosa, Tabasco. 86000.

²Colegio de Postgraduados. Laboratory of plant- microorganism molecular interaction.
Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.
C.P. 56230 Tel: (+52) 595 95 20 200 ext 1273.

*hortensia@colpos.mx

Abstract

Anecic, epigeous and endogeous earthworms stimulate or inhibit the growth of bacteria of agricultural importance inside their digestive tracts. It is possible that these bacteria establish a mutual symbiosis within the digestive tract of the earthworm. The bacterial species reported within the intestines of the earthworms belong to the genera *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Proteus*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Klebsiella*, *Azotobacter* and *Enterobacter*. These bacteria inhabit the soil and develop considerably when there are easily degradable organic soil nutrients. The bacterial community inside the digestive tract of earthworms pertains to at least four physiological groups: plant growth promoters, free-living nitrogen fixers, biocides and phosphate solubilizers. The diversity of bacterial communities within the digestive tracts of earthworms depends on climate, soil type and organic matter. The objective of the present work was to analyze the state of art on the bacterial diversity within the digestive tract of earthworms.

Key words: Anecic, epigeous, endogenous, symbiosis, soil.

Introduction

Anthropic activities such as deforestation, contamination and the advance of urban sprawls, lead the gradual disappearance of forests and other natural vegetation along with soil fauna which makes up the mega a macrofauna (Hernández-García, 2006; Hunta, 2002).

Earthworms are an important part of the macrofauna, visible with the naked eye ($>10,000 \mu\text{m}$), and represent 82% of the total biomass in tropical zones with a precipitation above 1000 mm (Lavelle *et al.*, 2006). The diversity of these macroorganisms depends on biotic conditions and factors such as temperature, humidity, apparent density, pH and organic matter which form part of their diet (Curry and Schmidt, 2007). Currently more than 7,245 species of oligochaetes have been classified at global level, from which 4000 earthworms species are described (Fragoso 2001; Reynolds, 1998). In Mexico, 129 species have been identified from which 46 are native, 47 exotic, and 36 others in which the majority belong to the family Megascolecidae (Fragoso, 2001).

Earthworms are a key component of the soil biological regulation systems, posses the capacity to remove soil particles and produce organomineral structures called biogenic structures (Rossi *et al.*, 2006). They also help to maintain soil structure, water infiltration and regulate the availability of nutrients assimilated for plants, which includes nitrogen (N) in the form of ammonia (NH_4^+) and nitrates (NO_3^-) (Desjardins *et al.*, 2003).

Earthworms mechanically mix mineral particles and organic matter through their digestive system which carries out disintegration, grinding and digestion of the ingested material, increasing or decreasing the activity and number of beneficial or pathogenic microorganisms (fungi, actinomycetes and bacteria) (Winding *et al.*, 1997). The participation of microorganisms within the digestive tracts of earthworms is of great importance given that a lot of these are involved in the degradation of organic matter (Byzov *et al.*, 2007). For studies on bacteria within the intestines of earthworms, diverse

methods and techniques have been used which have helped in identifying species of the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* and *Enterobacter* (Valle-Molinas *et al.*, 2007; Byzov *et al.*, 2007; Singleton *et al.*, 2003). These bacteria are mainly plant growth promoters, free-living nitrogen fixers and phosphate solubilizers (Loreno-Osti *et al.*, 2004; Martínez-Romero, 2001). Some authors have indicated the existence of a possible type of mutualism between these two organisms (Barois and Lavelle, 1986). Therefore, the objective of this study was to carry out a revision of the state of art of the role of these earthworms and the bacterial diversity within their digestive tracts.

Taxonomy and ecology of earthworms

Earthworms have been studied during the last years due to their importance in areas such as biotechnology, ecotoxicology, morphology, ecology, taxonomy, soil physics, and soil fertility (Amador and Görres, 2007; Aira *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2003; Homa *et al.*, 2003; Spurgeon *et al.*, 2003).

Earthworms have been classified within the Phylum Annelida, Order Oligochaeta and Class Clitella (Edwards and Lofty, 1977). The Order Oligochaeta consists of 12 families: Moniligastridae, Megascolecidae, Ocnerodrilidae, Acanthodrilidae, Octochaetidae, Eudrilidae, Glossoscolecidae, Sparganophilidae, Microchactidae, Hormogastridae, Criodrilidae, and Lumbricidae (Edwards and Lofty, 1977). From an agricultural point of view, the most important family is Lumbricidae and includes the genera *Lumbricus*, *Aporrectodea*, *Allolophora*, *Dendrobaena*, *Eisenia*, *Helodrilus*, *Octalasion* and *Eophila* (Edward, 2004). The family Glossoscolecidae includes two genera, *Periscolex* and *Pontoscolex*, which are of agricultural importance in tropical zones (Reynolds, 1998).

From an ecological point of view, earthworms have been classified in three categories: 1) epigeous, which live within the soil, interact with edaphic microbiota, and modify soil profile with their underground galleries and excrements; 2) endogenous, which transform dead fallen leaves, are soil consumers and are subdivided in poli, meso and oligohumics, with reduced interaction with microbiota and 3) anecic, which lives in and

consumes leaf litter (Curry and Schmidt 2007). This classification is used in diverse studies in order to establish the ecological category of these invertebrates under different agricultural systems in the Mexican Republic (Table 2.1).

Table 2.1. Ecological category of earthworm species under different agricultural systems in Mexico.

Specie	Category	Habitat	Reference
<i>Diplocardia</i> sp. <i>Apoccarrectodea caliginosa</i> <i>Phoenicodrilus taste</i>	Endogenous, Polihumics	Cereal cultivation systems, (Aguascalientes)	Brito <i>et al.</i> (2006)
<i>Phoenicodrilus taste</i>	Endogenous, Polihumics	Cereal cultivation systems, (Guanajuato)	Brito <i>et al.</i> (2006)
<i>Mayadrilus calakmulensis</i> <i>Dichogaster saliens</i>	Endogenous Epigeous	Family Orchards (Tabasco) Mango cultivation (Tabasco)	Huerta <i>et al.</i> (2005)
<i>Balanteodrilus pearsei</i>	Endogenous	Corn and sugarcane cultivation (Tabasco)	Huerta <i>et al.</i> (2005)
<i>Pontoscolex corethrus</i>	Endogenous, Poli- mesohumic	Pastorial systems with cereals (Veracruz)	García and Fragoso (2003)
<i>Diplocardia</i> sp3 <i>Pontoscolex corethrus</i>	Endogenous Endogenous	Sugarcane cultivation (Tamaulipas) Corn, sugarcane, Banana, coconut cultivation and pastures (Veracruz)	Fragoso (2001)
<i>Lodrilus bonampakensis</i>	Endogenous	Banana cultivation (Tabasco)	Fragoso (2001)
<i>Amynthas gracilis</i>	Epigeous	Banana Cultivation (Tamaulipas)	Barois <i>et al.</i> (1993)

In Mexico 129 species of earthworms have been identified where only 10 species have been studied from a point of view based on population, soil fertility and plant growth

(Fragoso, 2001). The exotic endogenous specie *Pontoscolex corethrurus* is considered geophagous and is one of the most researched species in tropical zones (García and Fragoso, 2003; Barois *et al.*, 1993; Barois, 1992).

Earthworms affect processes within the soil in a direct (incorporation and redistribution of several organic and inorganic materials, aeration, moisture distribution, infiltration) or indirect manner (formation of microbial communities, transportation of propagules and inhibition of pathogens) (Byzov *et al.*, 2007).

To some degree, the functions carried out by earthworms depend on the efficiency of their digestive systems which comprises of: mouth, pharynx, crop, intestines and anus (Figure 2.1). These invertebrates interact with soil microorganisms, as well as biological structures known as turricules (feces) which they produce within the soil (Curry and Schmidt 2007). Within their digestive systems, enzymatic activity is stimulated and may promote or inhibit the proliferation of certain fungal, actinomycetes and bacterial communities (Byzov *et al.*, 2007; Barois, 1992).

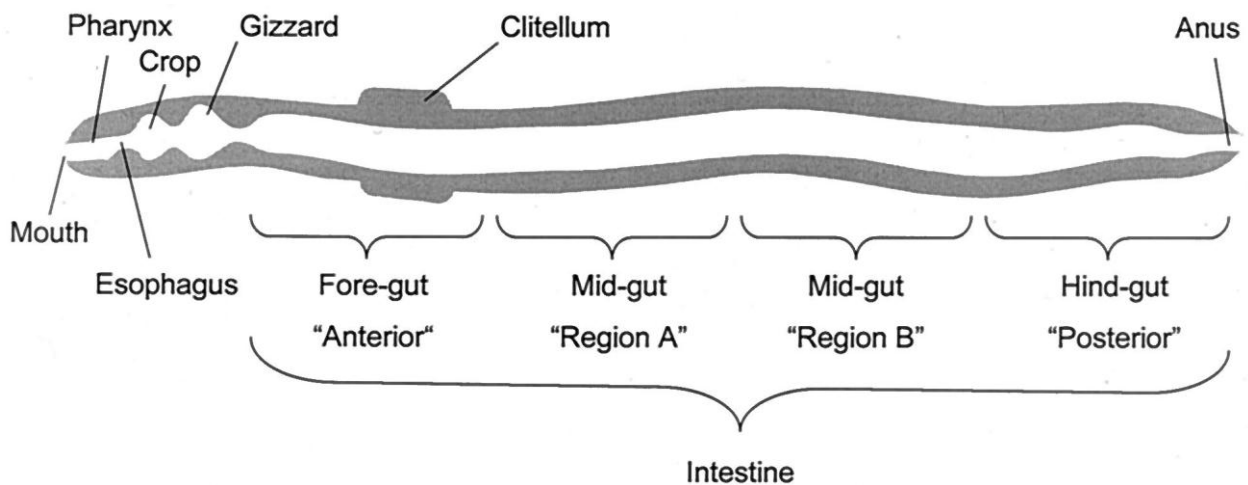


Figure 2.1. Diagram of the digestive system of an earthworm (Horn *et al.*, 2003).

Diversity of soil bacteria

Earthworms possess an immense bacterial diversity within their digestive tracts and is very little explored mainly because of the non-cultivable character of a large quantity of microorganisms which mainly come from soil.

Soil is an appropriate environment for the development of eukaryotic (algae, fungi, protozoa) as well as prokaryotic (bacteria and archaea) microorganisms. Virus and bacteriophage are also present (Nogales, 2005). All these organisms establish relationships among themselves in highly varied and complex ways which contribute to soil characteristics because of their role in the modification of solid, liquid and gaseous stages (Nunan, 2005).

Plant beneficial prokaryotes may have a considerable potential as biocontrol agents and biofertilizers. Two large groups are distinguished: (a) nitrogen fixing microorganisms and (b) plant growth promoting bacteria. The last group of bacteria is known as PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) or as root living bacteria which significantly stimulate plant growth (Loreno-Osti *et al.*, 2004; Espinosa-Victoria *et al.*, 2006).

Nitrogen fixing prokaryote microorganisms are classified into two groups: (1) obligated symbiotic, which infects the roots of legumes and (2) non-obligated symbiotics or free-living, which establishes relations with a range of gramineous plants. Within the second group, bacterial species from some genera like *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Vibrio* have been reported (Bashan *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2001).

Another group of soil bacteria is the phosphate solubilizing bacteria (PSB) which perform an important role supplementing di and monobasic phosphorous to plants. There are studies which have demonstrated the capacity of different species of bacteria which solubilize this insoluble phosphate, some of these bacteria belong to the genera *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratias*, *Agrobacterium*,

Burkholderia, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* and *Erwinia* (Fernández *et al.*, 2005).

Rizospheric bacteria are capable of producing physiologically active substances such as vitamins, gibberelins, cytokinins and acetic indole acid (AIA) in significant quantities. The genera *Azospirillum* and *Klebsiella* produce the auxin indol acetic acid (AIA), which causes morphological changes in the root and is related with the absorption of minerals mainly in corn and 'teocintle' (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006).

The alternative of using bacteria as a control agent against pathogens has developed certain bacterial strains with a wide spectrum of effectivity. Some species include *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. cepacia*, *Pseudomonas aerufasciens*, *P. chlororhapis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter* sp BF 14, *Serratia plymuthica*, *Serratia marcescens*, *Agrobacterium* sp (De Lima-Ramos *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1997).

Soil bacteria are not randomly distributed and thus follow special aggregation patterns at different scales (from nm to km) which they superimpose. This structure obeys to the effect caused by different control factors and is completely dynamic (Ettema, *et al.*, 2002). Bacteria organize themselves in micro colonies comprised of few cells that may pertain to different morphotypes (Nunan, *et al.*, 2003).

Microbial diversity within the digestive tract of earthworms

Plant detritus in soil is the main nutritional source for earthworms although a few microorganisms like protozoans, actinomycete, bacteria and fungi have been found to be part of the worms intestine (Table 2.2) (Byzov *et al.*, 2007; Hyun-Jung *et al.*, 2004; Furlong *et al.*, 2002; Szabó *et al.*, 1976). This relationship between microorganisms and oligochaetes is not necessarily limited to a predatory process, as it has been demonstrated that the digestive enzymes produced by the earthworms do not significantly affect on some microorganisms (Barois *et al.*, 1993).

Table 2.2. Microbial presence within the intestines of different species of earthworms.

Earthworm species	No. species of Bacterias	No. species of Actinomycetes	Habitat	Author
<i>Eisenia fetida</i>	91	-	Industrial waste	Hyun-Jung <i>et al.</i> 2004
<i>Lumbricus rubellus</i>	95	-	Agricultural soil	Furlong <i>et al.</i> 2002
<i>Lumbricus rubellus</i>	-	76	Forest soil	Kritufek <i>et al.</i> 1993
<i>Octolasion montanum</i>	-	175		
<i>Eisenia lucens</i>	-	145	Forest soil	Szabó <i>et al.</i> 1976

One of the first forefathers on microbial presence in the digestive system was Parle (1963) who reported bacterial, fungal and actinomycetic populations in three species of earthworms: *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora caliginosa* and *A. longa*.

A study carried out by Krištufek *et al.* (1994) found populations of bacteria, actinomycetes, fungi, sterile mycelium and plant cells in soil; however within the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus*, these organisms were found lysate except for a few actinomycetes, endospores and encapsulated bacteria. On the other hand, Márialigeti (1979) and Szabó *et al.* (1976) found that the microbial flora within the posterior segment of the intestine of *Eisenia lucens* contained 473 organisms where 73% belonged to the genus *Vibrio*.

Contreras (1980) reported that 70% of flora in the intestine of *Eisenia lucens* was represented by only one species of actinomycete, *Streptomyces lipmanii*, an organism rarely found in nature. On the other hand, Krištufek *et al.* (1993) identified two species of actinomycetes denominated *Streptomyces diastatochromogenes* and *Streptomyces noglalater*, which were characteristic of soil within the digestive tracts of the two earthworm species: *Lumbricus rubellus* and *Octolasion montanum*.

Dash *et al.* (1986) did a microfungus characterization in the digestive tract of three species of earthworms (*Ortochaetona surensis*, *Lampito maurittii* and *Drawida willsi*). They identified in the tropical zones of India 18 species of fungi from the genera

Aspergillus, *Penicillium*, *Thielavia*, *Botryotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Chaetomium*, and *Trichoderma*. Four more genera, namely *Neocosmospora*, *Cladosporium*, *Syncephalastrum* and *Actinomucor* were found in *L. mauritii*, unlike the other two species of earthworms. It is important to mention that the digested material for all three species came from organic waste.

Krištůfek *et al.* (1992) and Krištůfek *et al.* (1993) observed an increase in the number of bacteria, actinomycetes and fungi in the anterior section of the digestive tract of *Lumbricus rubellus* while the opposite occurred in *Aporrectodea caliginosa* and *A. caliginosa*.

The actinomycete community present in the intestine of *Eisenia fetida*, mainly *Streptomyces caeruleus*, develops better in the intestines in comparison to soil, and helps the earthworms to metabolize organic matter and decomposition of substances from plant origin (Polyanskaya *et al.*, 1996).

Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms

Soil is the key system in the functioning of terrestrial ecosystems. Vital processes as decomposition and nutrient flow take place within this system (Bashan *et al.*, 2004; Bouché, 1972). Biological activities control these processes, among them, prokaryotes and earthworms (Table 2.3) (Fragoso *et al.*, 2001).

Jolly *et al.* (1993) demonstrated the existence of physical contact between some filamentous, segmented bacteria and intestinal mucus of the species *Octolasion lacteum* and *Lumbricus terrestris*. The results showed bacterial filaments joined to the intestinal walls of the earthworms by means of hook structures. Therefore, it is concluded that the bacteria may be adapted to live within the intestines of the earthworms. Thus diverse studies on the main bacteria within the intestinal walls of earthworms have been conducted.

Table 2.3. Bacterial identified within the intestinal walls of earthworms.

Earthworm	Habitat	Classification	Bacteria	Author
<i>Onychochaeta boricana</i>	Soils por in organic matter	Growth promoting bacteria	<i>Bacillus sp</i>	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Onychochaeta boricana</i>	Forest soils			Mendez <i>et al.</i> (2002)
<i>Eisenia fetida</i>	Soils from industrial zones	Growth promoting bacteria	<i>Klebsiella sp</i>	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Lumbricuss rubellus</i>	Agroecosystems		<i>Azotobacter sp</i> <i>Enterobacter sp</i> <i>Pseudomonas sp</i>	
<i>Onychochaeta boricana</i>	Soils por in organic matter	Biocides	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Eisenia fetida</i>	Soils from industrial zones	Other bacteria	<i>Flavobacterium sp</i> <i>Nocardia sp</i> <i>Gordonia sp</i> <i>Vibrio comma</i> <i>Clostridium welchii</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Mycobacterium sp</i>	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)

An observation was made for the specie *Eisenia fetida* coming from contaminated soil in an industrial zone. There was an increase in 91 colonies, further divided into 12 groups: *Aeromonas* 6 %; *Agromyces* 3 %; *Bacillus* 31 %; *Bosea* 1 %; *Gordonia* 6 %; *Klebsiella* 6 %; *Microbacterium* 7%; *Nocardia* 2%; *Pseudomonas* 10 %; *Rhodococcus* 19 %; *Tsukamurella* and *Streptomyces*, 7 %. The genus *Bacillus* was the dominant group found in the intestine of this earthworm (Hyun-Jung *et al.*, 2004).

The species *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea tuberculata*, *Octolasion lacteum* and *Eisenia fetida* may establish a symbiotic relationship with bacteria from the genus

Acidovorax, given that these bacteria form nodules in the ampules of the nephridium of the earthworms and help in the process of protein decomposition (Shramm *et al.*, 2003).

On the other hand, Valle-Molinares *et al.* (2007) identified seven species of bacteria of the genus *Bacillus* (*B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* and *B. pabuli*) within the intestine of *Onychochaeta borincana*. All these species are typical soil bacteria. In addition, it was found that the microbial weight of the intestinal region decreased from the anterior to posterior section. Additionally, it was observed that some bacteria increased in the posterior section of the intestine, maybe because for a many bacteria this portion presents adequate conditions for their development.

Mendez *et al.* (2003) indicate that the bacteria can accomplish a type of mutualism during their passage through the digestive tract of earthworms, which have not yet been studied in other genera of bacteria. The existence of a mutual symbiotic relation between *O. boricana* and *B. cereus* has been proposed.

Molecular techniques used in the study of bacterial diversity within the digestive tracts of earthworms

The use of molecular techniques has manifested the unawareness of biological diversity, systemic classification and taxonomy given that the majority of microorganisms are not cultivatable in conventional culture media and also the analysis of functional genes key in important soil processes such as denitrification, nitrification nitrogen fixation and methane oxidation (Nogales, 2005).

Table 2.4 shows some molecular techniques used for the identification of bacteria found within the digestive tracts of earthworm, applying basic microbiological culture techniques (Santiago, 1995). This paragraph is very complicated: Many forms of microscopy (Krištůfek *et al.*, 1994) and molecular biology (Hyun-Jung *et al.*, 2004; Singleton *et al.*, 2003) (with the last being currently one of the most used techniques)

and its application in soil microbiology studies mainly in the digestive tract of earthworms, represent a great advance in the knowledge of different ecosystems.

The study of the diversity of microorganism is currently based on protein analysis, DNA or RNA of the ribosomal genes 16S or 23S and the presence of enzymes or enzyme alleles (Curry y Schmidt, 2007).

The identification process of bacteria associated with the intestines of earthworms is difficult if these microorganisms require growing conditions present only in the intestines of the earthworms. Singleton *et al.*, (2003) used molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR), for identifying bacteria associated with the intestines of *Lumbricus rubellus*, which were absent from the earthworms skin.

Table 2.4. Molecular techniques used to study of bacterial diversity within the digestive tract of earthworms.

Earthworm	Technique	Bacteria	Author
<i>Onychochaeta borincana</i>	Electron microscopy and PCR	Identified the genus <i>Bacillus</i> with seven different species and β - <i>bacteria hemolitica</i>	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Eisenia Fetida</i>	PCR-16sDNA	Identified 22 bacteria	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Onychochaeta borincana</i>	Electron microscopy	Identified seven bacteria of the genus <i>Bacillus sp.</i>	Méndez <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridation techniques and 16sRNA	Identified: <i>Acidobacteria</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Actinobacteria</i> .	Singleton <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>in situ</i> hybridation technique	<i>Bacillus megaterium</i> within the digestive tract	Fischer <i>et al.</i> (1995)

Fluorescent microscopy has been used for studying bacterial population variations within each intestinal segment of the oligochaetes. Fischer *et al.* (1995) and Fischer *et al.* (1997) studied the digestive intestinal walls of *O. borincana* using trace electronic microscopy and found bacteria from the genus *Bacillus* adhered to the intestine of this oligochaete being abundant in the frontal area and less abundant in the posterior parts. The authors suggested the smooth surface of the posterior part offers less possibility of adhesion for the bacteria on the intestinal wall but it appears that they may have found a favorable environment in the posterior part.

Conclusions

The importance of microbial diversity using conventional and molecular techniques is still far from understanding the role of the microorganisms within the digestive tracts of earthworms and within the soil in the functioning of ecosystem, particularly in those which have not been laboratory grown and for those whose metabolic capacities are totally unknown. They are key in important soil processes such as denitrification, nitrification, nitrogen fixation, methane oxidation, growth hormone production, phosphorous solubilization and control of microbial pathogens.

The bacterial diversity within the digestive tracts of earthworms from different genera and ecotypes presents a variety of prokaryote species, attributed to their habitat, soil type, climate, substrate type and biota.

The earthworm is an incubator and disperser of bacteria of agricultural importance given that some found species, perform as microbial controllers of certain pathogens (*Burkholderia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*), produce plant growth promoters like indole-3-acetic acid (*Klebsiella*, *Azotobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*), synthesize siderophore (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*), and act as phosphate solubilizers unavailable to plants (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratias*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* and *Erwinia*).

The genetic characterization of the isolated bacteria allows us to broaden our knowledge of the bacterial diversity within the different structures or parts of the digestive tract and under different natural ecosystems that present anthropogenic activities as well as the study of their effect on the growth plant.

Acknowledgements

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) for the economic support as scholarship student 208219, to the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) for the valuable support and to the Colegio de Postgraduados as the Institution for boarding and in the formation of the Doctorate in Agricultural Sciences.

References

- Aira, M., Monroy F., Domínguez J.** 2003. Effects of two species of earthworms (*Allolobophora* spp.) on soil systems: a microfaunal and biochemical analysis. *Pedobiologia*. 47:877-881.
- Amador, J.A., Gorres J.H.** 2007. Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry*. (8) 39:2070-2077.
- Barois, I.** 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climates. *Soil Biology and Biochemistry*. 24 (12):1510-1992.
- Barois, I., Villemin G., Lavelle P., Toutain F.** 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma*.56:57-66.
- Barois, I., Lavelle P.** 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. 18:539-541.
- Bashan, Y., Holguin G., de-Bashan L.E.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Bouché, M.B.** 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systematique. *Ann. Sol. Ecol. Anim.* Número especial. 72:1-671.
- Brito-Vega, H., Espinosa-Victoria D., Figueroa-Sandoval B., Fragoso C., Patrón-Ibarra J.C.** 2006. Diversidad de lombrices de tierra con labranza de conservación y convencional. *Terra Latinoamericana*. (1) 24: 99-108.
- Brown, G.G., Barois I., Lavelle P.** 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity the drilosphere and the role of interactions. *European Journal of Soil Biology*. (1) 38:177-198.
- Byzov, B.A., Khomyakov N.V., Kharin S.A., Kurakov A.V.** 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *European Journal of Soil Biology*. 43:146-156.

- Carcaño-Montiel M.G., Ferrera-Cerrato R., Pérez-Moreno J., Molina-Galán J.D., Bashan Y.** 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*. (4) 24:493-502.
- Cattelan, A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J.** 1999. Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670–1680.
- Compant, S., Duffy B., Nowak J., Clément Ch., Barka E.A.** 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. (9) 71: 4951–4959.
- Contreras, E.** 1980. Studies on the Intestinal Actinomycete Flora of *Eisenia lucens* (Annelida: Oligochaeta). *Pedobiologia*, 20: 411-416.
- Curry, J. P., O. Schmidt.** 2007. The feeding ecology of earthworms- A review. *Pedobiologia*, 50:463-477.
- Dash, H., Beura B.N., Dash M.C.** 1986. Gut load transit time, gut microflora and turnover of soil, plant and fungal material by some tropical earthworms. *Pedobiologia*. 29:13-20.
- Davidson, S.K., Stahl D.A.** 2006. Transmission of Nephridial Bacteria of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and Environmental Microbiology*. (1) 72:769–775.
- De Lima-Ramos M.R., Barbosa E., Paulino De A.S.M., André G.A.M., Peixoto N.A. R., Tenório S.D.V.M.** 2004. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, vol. 1, p.89-111.
- Decaëns, T.J., Galvis H., Amézquita E.** 2001. Propiedades de las estructuras construidas por los ingenieros del ecosistema en la superficie del suelo de una sabana colombiana. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Serie 3)* 24(5): 465-478.
- Edwards, A.C.** 2001. Earthworms. The soil biology primer. Soil Quality Institute. Natural Resource Conservation Service, United States department of Agriculture. Pp. 1-4.
- Edwards, A.C., Lofty J.R.** 1977. Biology of earthworms. (Ed): Chapman and Hall. Boca Raton, London. Pp. 1-261.
- Egert, M., Marhan S., Wagner B., Scheu S., Fredrich M.W.** 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol.*, 48:187-197.
- Espinosa-Victoria D., Hernández-Flores L., López-Reyes L.** 2006. Diversidad genética de *Azospirillum brasilense* en suelos cultivados con maíz bajo labranza convencional y de conservación. *Terra Latinoamericana*. (2) 24:215-223.
- Ettema, C.H., Wardle D.A.** 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17: 177-183.
- Feinberg, L., Jorgensen J., Haselton A., Pitt A., Rudner R., Margulis L.** 1999. Arthromitus (*Bacillus cereus*) symbionts in the cockroach *Blaberus giganteus*: dietary influences on bacterial development and population density. *Symbiosis*, 27: 104–123.
- Fernández L.A., Zalba P., Gómez M.A., Sagardoy M.A.** 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cl. Suelo (Argentina)* (1) 23:31-37.

- Fischer, K., Hahn D., Amann R.I., Daniel O., Zeyer J.** 1995. In situ analysis of the bacterial community in the gut of of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. *Can. J. Microbiol.* 41:666-673.
- Fragoso, C.** 2001. Las lombrices de tierra de México (ANNELIDA, OLIGOCHAETA): diversidad, ecología y manejo. *Acta Zoologica Mexica.* Número especial. 1:131-171.
- Fraser, P.M., Baera M.H., Butler R.C., Harrison-Kirk T., Piercy J.E.** 2003. Interaction between earthworms (*Aporrectodea caliginosa*), plants and crop residues for restoring properties of a degraded arable soil. *Pedobiologia.* 47:870-876.
- Furlong, M., Singleton D., Coleman D., Whitman W.** 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and cast of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (3):1265-1279.
- García, J.A., Fragoso C.** 2003. Influencia of different food substrates on growth and reproduction of two tropical eartworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*). *Pedobiologia.* 47:754-763.
- García-Pérez, R.** 2006. La lombriz de tierra como una biotecnología en agricultura. Universidad Autonoma Chapingo. Edo, de México.
- Hernández-García M.A., Granados-Sánchez D.** 2006. El parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan y el impacto ecológico-social de su deterioro. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 12 (2):101-109.
- Homa, J., Niklinska M., Plytycz B.** 2003. Effect heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*. *Pedobiologia.* 47:640-645.
- Horn, M.A., Schramm A., Drake H.L.,** 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1662–1669.
- Huerta E., Rodríguez-Olán J., Evia-Castillo I., Montejo-Meneses E., de la Cruz-Mondragón, M., Gracia-Hernández R.** 2006. La diversidad de lombrices de tierra (ANNELIDA, OLIGOCHAETA) en el estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia.* 21 (42):73-83.
- Hunta, V.** 2002. Soil macroarthropod communities in planted birch stands in comparison with natural forests in central Finland. *Applied Soil Ecology.* 20 (3):199-209.
- Hyun-Jung, K., Kwang-Hee S., Chang-Jun Ch, Hor-Gil H.** 2004. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47 (3):137-142.
- Jolly, J.M., Lappin-Scott H.M., Anderson J.M., Clegg C.D.** 1993. Scanning electron microscopy of two earthworms: *Lumbricus terrestris* and *Octolasion cyaneum*. *Microb. Ecol.*, 26:235-245.
- Krištůfek, V., Ravasz K., Pizl V.** 1992. Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.*, 24(12): 1499-1500.
- Krištůfek, V., K. Ravasz, V. Pizl.** 1993. Actinomycete communities in earthworm guts and surrounding soil. *Pedobiologia,* 37: 379-384.
- Krištůfek, V., K. Ravasz, V. Pizl.** 1994. Ultrastructural analysis of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoff. (Annelida, Lumbricidae). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41(3): 283-290.

- Lavelle, P., C. Lattaud, D. Trigo, I. Barois.** 1995. Mutualism and biodiversity in soils. H. P. Collins, G. P. Robertson, M. J. Klug (eds). The significance and regulation of soil biodiversity. 23-33. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Lavelle, P., D. Bignell, M. Lepage, V. Wolters, P. Roger, P. Ineson, O. W. Heal, S. Dhillion.** 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology*. 33 (4):159-193.
- Lee, K.E.** 1985. Earthworms, Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use. Academic Press, Australia.
- Loredo-Osti C., López-Reyes L., Espinosa-Victoria D.** 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. (2) 22:225-239.
- Márialigeti, K.** 1979. On the community-structure of the gut-microbiota of *Eisenia lucens* (Annelida, Oligochaeta). *Pedobiologia*, 19: 213-220.
- Martínez-Romero, E.** 2001. Poblaciones de *Rhizobia* nativas de México. *Acta Zool. Mex.* (n.s.). Número especial 1:29-38.
- Mendez, R., Borges S., Betancourt C.** 2003. A microscopical view of the intestine of *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta:Glossoscolecidae). *Pedobiologia*. 47:900-903.
- Nogales, B.** 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 1-10.
- Nunan, N., Wu K., Young I.M., Crawford J.W., Ritz K.** 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 203-215.
- Parle, J.N.** 1963. Micro-organisms in the intestine of earthworms. *J. Gen. Microbiol.* 31:1-11.
- Polyanskaya, L.M., Babkina N.I., Zenova G.M., Zvyagintsev D.G.** 1996. Fate of Actinomycetes in the intestinal tract of soil invertebrates fed on Streptomyces spores. *Microbiology*, 65(4): 493-498.
- Pop, V.V.** 1998. Earthworm biology and ecology-A case study: The genus *Octodrilus* Omodeo, 1995 (Oligochaeta: Lumbricidae), from the Carpathians. Pp. 65-122. *In:* Edwards, A. C. (ed). *Biology of Earthworms*. Ed. Chapman and Hall. Boca Raton, London.
- Reynolds, W.J.** 1998. The status of earthworms biogeography, diversity, and taxonomy in north America revisited with Glimpses into the future. Pp. 15-64. *In:* Edwards, A. C. (ed). *Biology of Earthworms*. Ed. Chapman and Hall. Boca Raton, London.
- Santiago, A.** 1995. Estudio de la flora bacteriana intestinal de *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) en Puerto Rico. MS thesis, University of Puerto Rico, Mayagüez.
- Singleton, D.R., Hendrix P.F., Coleman D.C., Whitman W.B.** 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae: Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. (12) 35:1547-1555.
- Spurgeon, D., Weeks J.M., Gestel C.A.M.** 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*. 47:588-606.
- Szabó, I.M., Marton M., Butti I., Fernández C.** 1976. A diagnostic key for the identification of "species" of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* included in the International *Streptomyces* Project. *Acta Bot. Hung.*, 21: 387-418.

- Valle-Molinares, R., Borges S., Rios-Velazquez C.** 2007. Characterization of possible symbionts in *Onychochaeta borincana* (Annelida:Glossoscolecidae). *European Journal of Soil Biology.* 43:14-18.
- Winding, A., Rohn R., Hendriksen N.B.** 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry.* 24:133-140.
- Young, J. M., Kuykendall L.O., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undica* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. Rubi*, *R. undicola*, and *R. vitis*. *Agrom. J.* 79:172-176.
- Zhang, F., Dashti N., Hynes R.K., Smith D.L.** 1997. Plant Growth-promotion Rhizobacteria and Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Growth and Physiology at Suboptimal Root Zone Temperatures. *Annals of Botany.* 79:243-249.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN BACTERIANA DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LOMBRIZ DE TIERRA *Pontoscolex corethrurus*

Characterization of bacteria in gut of the earthworm *Pontoscolex corethrurus*

Brito-Vega Hortensia¹, Espinosa-Victoria David*², Barois Boullard Isabelle³, Gómez-Vázquez Armando¹, Lavelle Patrick⁴

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco. CP. 86000. Tels. +52 (993) 3581500 ext. 6602, 3581585 y 1429151, ²Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. De México. ³Instituto Ecología A.C., Jalapa, Veracruz. ⁴Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux, IRD/ Ile de France/Université Paris VI.

*despinos@colpos.mx

RESUMEN

Las lombrices de tierra estimulan o inhiben el crecimiento de bacterias de importancia agrícola dentro de su tracto digestivo. El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar morfológicamente y bioquímicamente a las bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*. El muestreo de la especie *P. corethrurus* se realizó en dos localidades de Veracruz, México: Plan de las Hayas, zona ganadera con suelo arcilloso y La Mancha, zona de reserva ecológica y con suelo arenoso. El intestino de las lombrices fue dividido en cuatro secciones (A, B, C y D). Bajo condiciones asépticas, el contenido intestinal fue colocado en diluciones con medio líquido Brain Heart Infusion. Posteriormente, se sembró en los medios selectivos para bacterias. La identificación taxonómica y metabólica enzimática de las bacterias se realizó con los kits API20E[®], API20NE[®] y software apiweb[™]. Las especies de bacterias identificadas en el contenido intestinal de *P. corethrurus* fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *A. salmonicida ssp salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum*

anthropi, *Photobacterium damsela*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens group*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Vibrio parahaemolyticus*. Pero en el tracto digestivo de *P. corethrurus* de la Mancha no se identificaron: *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Psychrobacter phenylpyruvicus*. El género *Pseudomonas* fue el más predominante con cuatro especies tanto en Plan de las Hayas como en La Mancha. Los resultados indican que las lombrices de la especie *P. corethrurus* colectadas en las dos zonas existe diferencia en cuanto a su diversidad bacteriana del tracto digestivo. Es probable que el tipo suelo y el ecosistema condicione la diferencia en la diversidad bacteriana. La catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa, cisteinasa estas enzimas presentes en las bacterias son ingeridas por la lombriz de tierra geófaga realizando un mutualismo anisosimbiótico.

Palabras claves: *Api E20*, *Photobacterium*, *endogeas*, *Pseudomonas*.

INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas han conducido al deterioro de los recursos naturales de selvas y bosques, afectando directamente la diversidad de la mega y macrofauna del suelo (Formicidae, Isóptera, Amfípoda, Isopoda, Centípodos, Milípodos), y los invertebrados como la clase oligochaeta (lombrices de tierra) (Huhta, 2002; Hernández-García y Granados-Sánchez, 2006). Las lombrices de tierra realizan la mezcla mecánica de las partículas minerales y la materia orgánica del suelo a través de su sistema digestivo. En éste sistema comienza la disgregación, molienda y digestión del material ingerido, lo cual puede conducir a la reducción o incremento del número de microorganismos (hongos, actinomicetos y bacterias) tanto benéficos como patógenos (Barois *et al.*, 1993; Winding *et al.*, 1997). La participación de los microorganismos en el tracto digestivo de la lombriz es de gran importancia para el proceso de la degradación de la materia orgánica (Lavelle *et al.*, 1995; Singleton *et al.*, 2003; Lavelle *et al.*, 2006; Valle-Molinas *et al.*, 2007; Byzov *et al.*, 2007). Para la caracterización de las bacterias en el intestino de la lombriz, se han usado diversos métodos, no obstante el uso de técnicas fenotípicas podría mejorar el conocimiento de la diversidad biológica, de la clasificación sistemática y la taxonómica, de una manera más rápida y general en la

identificación y caracterización en la mayoría de los microorganismos. El empleo de medios específicos ha ayudado a identificar géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Enterobacter* (Singleton *et al.*, 2003; Hyun-Jung *et al.* 2004; Valle-Molinas *et al.*, 2007; Byzov *et al.*, 2007). Estas bacterias son en su mayoría promotoras de crecimiento vegetal, libres fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato. Por otro lado, se ha indicado la existencia de un mutualismo entre la lombriz de tierra y estos microorganismos (Barois y Lavelle, 1986; Lavelle y Spain, 2001; Valle-Molinares *et al.*, 2007). El mutualismo entre la lombriz de tierra geófaga y la microflora del suelo es de tipo anisosimbiótica (debido a la diferencia en tamaños entre ambos simbioses), y tiene como función descomponer el material orgánico ingerido por la lombriz de tierra (Lavelle *et al.*, 1987; Lavelle *et al.*, 1995). Esto porque la gran mayoría de los invertebrados del suelo no posee enzimas para digerir directamente la celulosa, la lignina, los taninos y los complejos húmicos; en cambio, estas enzimas están presentes en los microorganismos. Estos últimos son ingeridos por los invertebrados, y así dentro del tracto degradan los compuestos complejos por medio de las enzimas que producen (Barois, 1992; Barois *et al.*, 1993; Lattaud *et al.*, 1998). La lombriz *P. corethrurus* pertenece a la Orden Haplotaxida, Familia Glossoscolecidae y presenta coloración rosa en la cabeza, glándulas calcíferas, aproximadamente de 5-10 cm de longitud; con el clitellum localizado en los segmentos 13 al 22. Es una especie exótica endógena y es considerada como geófaga, se encuentra ampliamente distribuida en todo el trópico y es de las especies más investigadas en la zona tropical desde el punto de vista poblacional, de su papel en la fertilidad del suelo y su efecto en el crecimiento de la planta (Lavelle *et al.*, 1987; Barois, 1992; Barois *et al.*, 1993; García y Fragoso, 2003). El objetivo del presente trabajo fue determinar la identificación y caracterización morfológica y bioquímica en las bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*, proveniente de dos tipos de suelos, uno arcilloso (Plan de Hayas) bajo pastoreo con ganado bovino y el otro arenoso (La Mancha) con cultivo de banana de una zona ecológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de colecta

La colecta especies *P. corethrurus* se realizó en dos zonas del estado de Veracruz Plan de las Hayas y la Mancha (Cuadro 3.1):

1. Plan de las Hayas, Veracruz ubicada en las coordenadas 18° 27' latitud norte y 96° 21' longitud oeste a una altura de 860 metros sobre el nivel del mar, sus recursos naturales son el forestal, el agrícola y el ganadero; el tipo de suelo es un vertisol con textura arcillosa; su temperatura media anual es de 18° C y posee un clima templado húmedo semifrío; con una precipitación pluvial media anual de 1,509.1 mm (Barois, 1987).
2. La Mancha está ubicada al noroeste de ciudad de Cardel en el municipio de Actopan, sus coordenadas son 96° 22' de longitud oeste y 19° 36' latitud norte. La Mancha es una zona de conservación de fauna y flora, y con una plantación de banana. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación oscila entre 1200 y 1500 mm anuales. El suelo es un regosol pobre en materia orgánica y arenoso, y la temperatura media anual varía entre 22° C y 26° C (Barois, 1987).

Cuadro 3.1. Características generales de los dos sitios de muestreo, La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz (Barois *et al.* 1999; Barois 1987).

Sitio de estudio	La Mancha	Plan de las Hayas
Ecosistema	Achual	Pastizal
Vegetación	Selva media subcaducifolia	Selva media
Altitud (msnm)	Nivel del mar	850
Temperatura	18 – 22 °C	22 °C
Precipitación	1200 – 1500 mm	800 mm
Sustrato	Arenosol cámbico	Vertisol éutrico
C	1%	4%
N	0.1%	0.36%
Textura	arenosa	arcillosa
Capacidad de campo	10%	35%

La caracterización de la microflora intestinal

Caracterizar las bacterias tuvo un diseño trifactorial con los siguientes niveles: el Factor 1) tiene dos niveles siendo 2 tipos de suelo el de Plan de las Hayas (PH) y La Mancha

(M), el Factor 2) tiene 4 niveles que corresponden a las secciones del intestino: A, B, C y D. y el Factor 3) tiene 5 niveles que son los medios selectivos para bacterias: agar nutritivo (AN), agar de soya tripticaseina (AST) medio de King (MKA), *Pseudomonas* (PF) y agar ABHI con cuatro repeticiones, respectivamente.

Fijación de la lombriz de tierra

Se seleccionaron 20 individuos adultos de *P. corethrus*, los cuales se lavaron con agua destilada para que quedaran libres del suelo externamente y uno por uno se sumergieron para tres lavados en etanol 70 % entre 10 a 30 s; posteriormente en agua destilada-estéril a una temperatura de 50° C por 10 s (Hyun-Jung *et al.*, 2004). Este paso fue muy importante, porque tiene como objetivo el de no matar a las bacterias del sistema digestivo. Para extraer el contenido intestinal el cuerpo de la lombriz de tierra fue diseccionado a todo lo largo hasta llegar al intestino donde se dividió en las cuatro secciones: (A) segmentos 1 al 35, (B) segmentos 36 al 69, (C) segmentos 70 al 101 y (D) segmentos 102 al 135, (ver la Figura 3.1.)

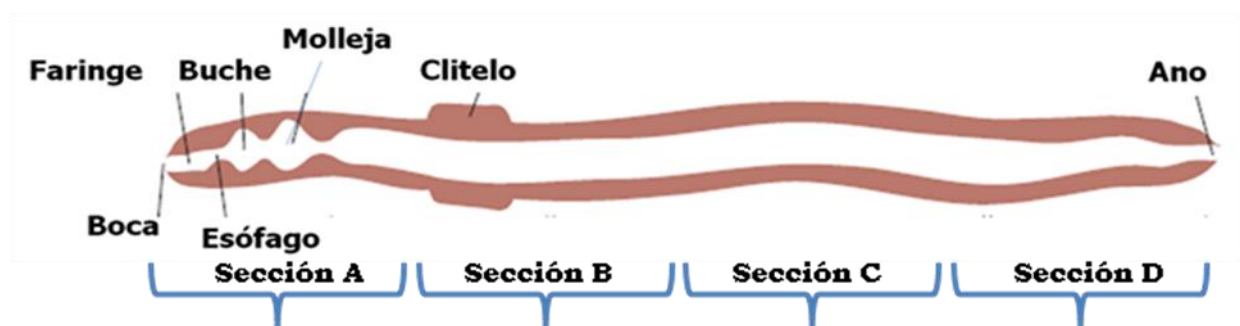


Figura 3.1. El cuerpo de una lombriz de tierra con las secciones del sistema digestivo (Modificada de Horn *et al.*, 2003).

Unidades formadoras de colonia y aislamiento de bacterias

Las unidades formadoras de colonias (UFC) de las bacterias del contenido intestinal de *P. corethrus* se efectuó colocando aproximadamente 1 g del sustrato húmedo de los contenidos intestinales de tres lombrices, aproximadamente, por regiones A, B, C y D en un tubo para obtener la dilución 10^{-1} o solución madre en medio líquido Brain Heart Infusion (BHI) DIFCO®; este medio líquido es adecuado para enriquecimiento y cultivo

de bacterias aerobias y anaerobias, y difícil desarrollo. Posteriormente de esta dilución 10^{-1} se realizaron las diluciones sucesivas hasta 10^{-9} de cada sección (A, B, C y D). Las diluciones de 10^{-4} hasta la 10^{-9} fueron sembradas en placa (caja Pétri), agar nutritivo (AN) para aislamiento de bacterias poco exigentes en requerimientos nutritivos y no contiene inhibidores del desarrollo bacteriano, agar de soya tripticaseína (AST) provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, y fuente de nitrógeno y minerales, medio de B King (MKA) y *Pseudomonas* (PF) son medios para la detección y diferenciación de especies del género *Pseudomonas* spp., en base a la producción de fluoresceína y agar ABHI. Por cada dilución se hicieron tres repeticiones por cada medio de cultivo. Las Placas se incubaron por 24 h a 30° C, después se procedió a determinar el crecimiento y el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC ss g^{-1}). Al mismo tiempo, se procedió al aislamiento y purificación de las colonias de bacterias (Horn *et al.*, 2003; Hyun-Jung *et al.* 2004; Valle-Molinas *et al.*, 2007).

Posteriormente, se seleccionó las colonias de la dilución 10^{-5} , por que fue donde se presentó un número de colonias representativas y bien aisladas, para obtener cepas puras de los medios de cultivo selectivo AN, AST, MKA, PF y ABHI. Las placas inoculadas se incubaron a 30° C durante 24 h, después se verificó la pureza de los aislamientos, si no lo eran, se volvían a resembrar las colonias de bacterias en placas con su medio respectivo, hasta obtener colonias de bacterias puras.

Se estimó el porcentaje de humedad del contenido intestinal de *P. corethrurus* con los datos de Barois (1987) y a partir de la siguiente ecuación para calcular las UFC ss g^{-1} :
$$UFC\ ss\ g^{-1} := (NC * 1 / FD * 1 / V) / (P * FH).$$

Donde:

UFC ss g^{-1} = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC = número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la placa (10^{-2} a 10^{-10}).

V = volumen inoculado en la caja = 1 ml.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad ($1 - (\% \text{ humedad} / 100)$).

Morfología de las bacterias

La morfología celular (cocos, bacilos y espirilos) y la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas se observó con la técnica de tinción de Gram. MacConkey agar es un medio selectivo y diferencial para microorganismos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos, y bacilos entéricos, las colonias que presenten color rosa son Gram positivas y de color incoloro o muy claro son Gram negativos (Figura 3.2) (MacFaddin, 2004). Las bacterias son móviles por medio de flagelos, estos flagelos aparecen sobre todo entre los bacilos y algunos en cocos, con el medio MIO DIFCO® se determinó si es móvil o inmóvil la bacteria, si migra desde la línea de siembra y difunden en el medio, lo que produce una turbidez o cambio de color claro y puede mostrar estrías de crecimiento veloso es positivo (Figura 3.2) (MacFaddin, 2004).

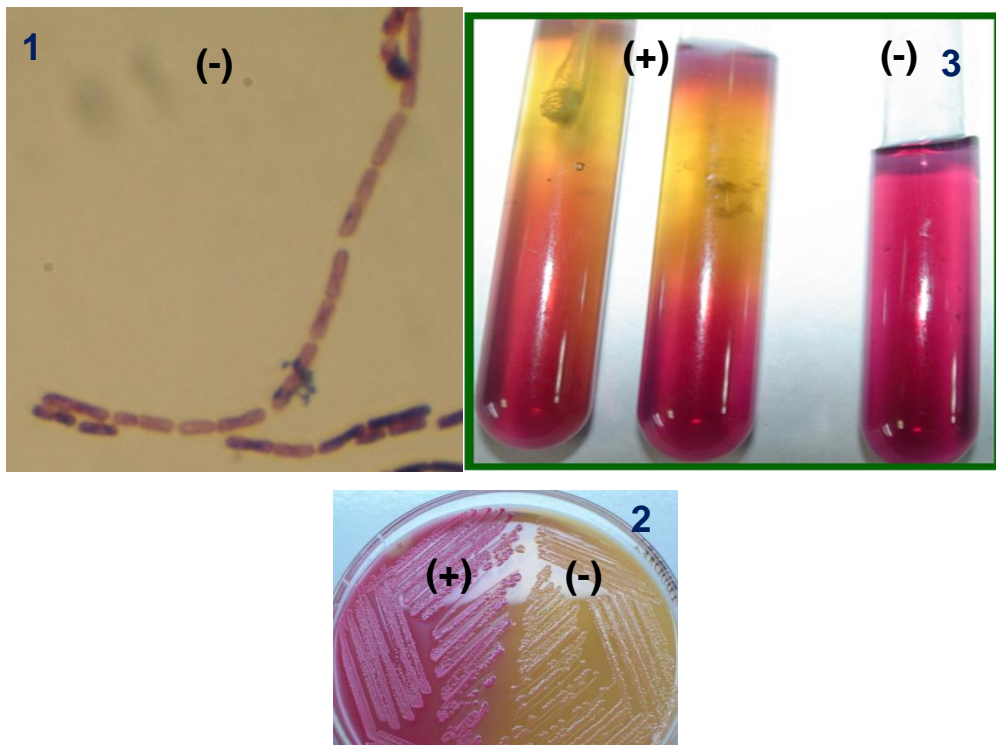


Figura 3.2. (1) Tinción de Gram, (2) MacConkey agar y (3) Movilidad con el medio MIO DIFCO® positivo o negativo de las bacterias aisladas del tracto digestivo *Pontoscolex corethrurus*.

Metabolismo e identificación fenotípica de las bacterias

La determinación del metabolismo bacteriano consistió en una serie de reacciones enzimáticas como la catalasa, la oxidasa, la proteasa, cisteinasa, triptofanasa y ureasa (Smith *et al.*, 1964; MacFaddin, 2004). Se determinó también la capacidad de algunos microorganismos para sintetizar acetoina, el producto final en la reacción Voges-Proskauer (VP) que se basa en la detección del acetilmetocarbinol con un medio comercial VP DIFCO®. Igualmente, se determinaron los procesos de fermentación y oxidación en el que se metabolizan la glucosa y otros carbohidratos con el medio O/F DIFCO®. Por último se determinó la identificación del género y especie de las colonias bacterianas aisladas al aplicar tests de actividades enzimáticas con kits de BioMerieux® API®NE20 (Cuadro 3.2) y API®E20 para enterobacterias (Bradshaw, 1973; MacFaddin, 2004). Estos kits se inocularon con una colonia de bacteria aislada en cada capsula por galería (Figura 3.3) y se incubaron por 24 y 48 h. Posteriormente se leyeron los resultados de cada galería de API por medio del software apiweb™ (Soto *et al.*, 1994).

<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>

Las frecuencias de las bacterias

Las frecuencias se determinaron considerando el número de veces que aparece una bacteria de un mismo taxón en las secciones (A, B, C y D) del tracto digestivo de *P. corethrus* aislada de Plan de las Hayas y la Mancha. El porcentaje de cada frecuencia corresponde al total de la presencia bacteriana por 100 entre N que es el 100 % del conjunto (Freud y Walpole, 1990).

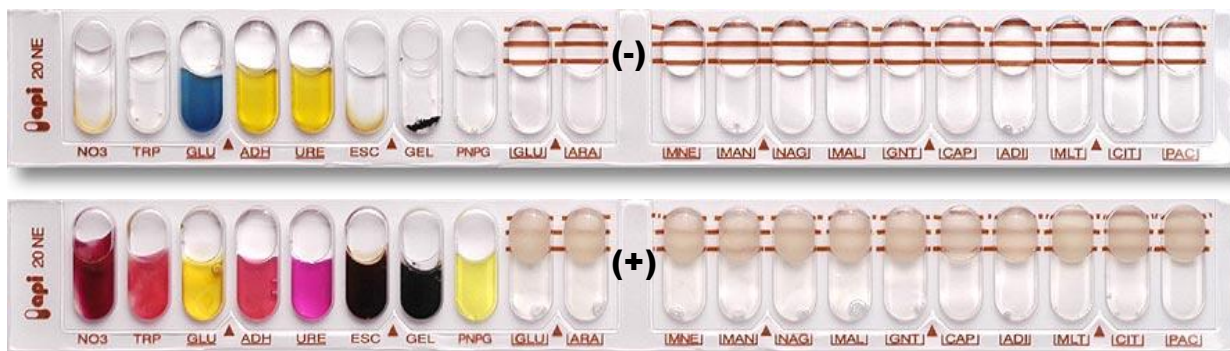


Figura 3.3. La galería de API®NE20 pruebas negativas y positivas de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria.

Cuadro 3.2. Tests de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria de las galerías API[®]NE20 y E20 BioMerieux[®].

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	REACCIONES/ENZIMAS	TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	REACCIONES/ENZIMAS
API[®]NE20			API[®]E20.		
NO ₃	Nitrato Potásico	Reducción de nitratos en nitritos Reducción de nitratos en nitrogeno	ONPG	2-nitro-fenol-βD-galactopiranosida	B-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)
TRP	L-triptofano	Formación de indole (Tryptofano)	ADH	L-arginina	Arginina-dihidrolasa
GLU	D-glucosa	Fermentación (Glucosa)	LDC	L-lisina	Lisina Decarboxilasa
ADH	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	ODC	L-ornitina	Ornitina Decarboxilasa
URE	Urea	Ureasa	CIT	Citrato trisódico	Utilización de citrato
ESC	Esculina Citrato férrico	Hidrólisis (β-glucosidasa) (Esculina)	H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción H ₂ O
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrólisis (proteasa) (gelatina)	URE	urea	Ureasa
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (Para-NitroFenil-βD-Galactopiranosidasa)	TDA	L-triptófano	Triptofano Desaminasa
GLU	D-glucosa	Asimilación Glucosa	IND	L-triptófano	Producción de Indole
ARA	L-arabinosa	Asimilación Arabinosa	VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
MNE	D-manosa	Asimilación Manosa	GEL	Gelatina (origen bovino)	Gelatinasa (Gelatina)
MAN	D-manitol	Asimilación Manitol	GLU	D-glucosa	Fermentación/oxidación (Glucosa)
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación N-Acetil-Glucosamina	MAN	D-manitol	Fermentación/oxidación (Manitol)
MAL	D-maltosa	Asimilación Maltosa	INO	Inositol	Fermentación/oxidación (Inositol)
GNT	gluconato potásico	Asimilación Gluconato potásico	SOR	D-sorbitol	Fermentación/oxidación (Sorbito)
CAP	ácido cáprico	Asimilación ácido caprico	RHA	L-ramnosa	Fermentación/oxidación (Rhamnosa)
ADI	ácido adipico	Asimilación ácido adipico	SAC	D-sacarosa	Fermentación/oxidación (Sacarosa)
MLT	ácido málico	Asimilación Malata	MEL	D-melibiosa	Fermentación/oxidación (Melibiosa)
CIT	citrato trisódico	Asimilación citrato trisódico	AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación (Amygdalina)
PAC	ácido fenilacético	Asimilación ácido fenilacético	ARA	L-arabinosa	Fermentación/oxidación (Arabinosa)
OX	-----	citocromo-oxidasa	OX	-----	citocromo-oxidasa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

En el Cuadro 3.3 se presentan las unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas aisladas en las cuatro secciones (A, B, C y D) del contenido intestinal del *P. corethrurus* de las localidades La Mancha y Plan de las Hayas. En las secciones A, B, C y D del sistema digestivo *P. corethrurus* se observó el mayor número de UFC por gramo de suelo seco (ss g⁻¹) (39x10⁵, 45x10⁵, 50x10⁵ y 50x10⁵, respectivamente) en el medio ABHI en el suelo arenoso de La Mancha; este medio es adecuado para enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias y anaerobias, por el requerimiento de este medio para el crecimiento difícil y desarrollo de las especies bacterianas Factor X (porción hem de la hemoglobina (protoporfirina) necesaria para síntesis de las enzimas respiratorias; también denominada, hemina y hematina; termoestable) y Factor V (coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); termolábil) (MacFaddin, 2004). En contraste, en Plan de las Hayas el mayor número de UFC ss g⁻¹ en las cuatro secciones (A, B, C y D) del tracto digestivo (34x10⁵, 45x10⁵, 45x10⁵ y 34x10⁵, respectivamente) se obtuvo en el medio PF en un suelo arcilloso. Esta diferencia UFC ss g⁻¹ por PF de los otros medios de cultivo puede deberse a que este medio de cultivo se basa en la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. por que se basa a la producción de piocianina, la peptona de gelatina que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína (Walker *et al.*, 2004; De Leij *et al.*, 1994).

El número promedio de las UFC ss g⁻¹ de los medios de crecimiento presentó el mismo comportamiento tanto en La Mancha (26x10⁵, 27x10⁵, 39x10⁵ y 25x10⁵) como en Plan de las Hayas (35x10⁵, 40x10⁵, 41x10⁵ y 29x10⁵), va aumentando de la sección A hasta la C y disminuye en la sección D del contenido del intestino de la lombriz de tierra. Barois (1987) reportó 5x10⁵, 12x10⁵ y 32x10⁵ UFC· ss g⁻¹ en las zonas anterior media y posterior del tracto digestivo de *P. corethrurus*, respectivamente en suelo de

Plan de las Hayas siendo valores similares a los encontrados aquí. De la misma manera, Krišrtúek *et al.*, (1992) reportaron $7 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$, 16×10^6 y 29×10^6 UFC ss g^{-1} en el tracto digestivo *L. rubellus*, observándose aumento de éstas de la parte anterior a la posterior del intestino. Los datos reportados UFC ss g^{-1} por la literatura y los resultados de esta investigación tienen el mismo comportamiento a lo largo del sistema digestivo de las lombrices de tierra.

Cuadro 3.3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las bacterias aisladas, de las secciones del tracto digestivo *P. corethrurus*, en las zonas La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz y bajo diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Región A	Región B	Región C	Región D	Promedio
	La Mancha (UFC ss g^{-1})				
Agar nutritivo	22×10^5	34×10^5	45×10^5	17×10^5	30×10^5
Agar de soya tripticaseina	28×10^5	11×10^5	34×10^5	11×10^5	21×10^5
<i>Pseudomonas (PF)</i>	11×10^5	22×10^5	22×10^5	22×10^5	29×10^5
Medio de King	28×10^5	22×10^5	45×10^5	22×10^5	29×10^5
Agar Brain Heart Infusion	39×10^5	45×10^5	50×10^5	50×10^5	46×10^5
Promedio	26×10^5	27×10^5	39×10^5	25×10^5	39×10^5
	Plan de las Hayas (UFC ss g^{-1})				
Agar nutritivo	34×10^5	39×10^5	39×10^5	28×10^5	35×10^5
Agar de soya tripticaseina	39×10^5	39×10^5	45×10^5	22×10^5	36×10^5
<i>Pseudomonas (PF)</i>	34×10^5	45×10^5	45×10^5	34×10^5	39×10^5
Medio de King	28×10^5	45×10^5	45×10^5	34×10^5	38×10^5
Agar Brain Heart Infusion	39×10^5	34×10^5	34×10^5	28×10^5	34×10^5
Promedio	35×10^5	40×10^5	41×10^5	29×10^5	36×10^5

Características morfológicas y reacciones enzimáticas de las bacterias

En el Cuadro 3.4 se presenta los datos de morfología y reacciones enzimáticas de 190 bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrurus*, mediante las reacciones enzimáticas se pudo identificar nueve géneros: *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Sphingomonas* y *Vibrio* (Anexo A). No todos los géneros presentaron actividades enzimáticas de la catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa, cisteinasa, y reducción de nitratos a nitritos. Los resultados muestran la existencia de diversidad, no solo a nivel de género sino también a nivel metabólico en bacterias aisladas en el tracto digestivo *P. corethrurus*. La diversidad metabólica detectada habilita a las bacterias a degradar y reducir compuestos orgánicos como la celulosa, hemicelulosa, lignina, quitina, pectina, proteínas, péptidos, lípidos y peptidoglicano en las regiones de la Mancha y Plan de las Hayas.

El género *Aeromonas* aislada del contenido intestinal *P. corethrurus* presentó forma de bacilo, Gram negativas, que morfológicamente se asemeja a los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Este género metabolizó la catalasa, la oxidasa, la triptofanasa, gelatinasas y la citratasa; y reduce nitratos a nitritos (Cuadro 3.4). Se han descrito en la literatura catorce especies de *Aeromonas*, la mayoría de las cuales han sido asociadas con enfermedades humanas. Los patógenos más importantes son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. yeronii* biovar sobria (O'Reilly y Day, 1983; Cesar *et al.*, 2010).

Cuadro 3.4. Características morfológicas y reacciones enzimáticas de las bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrurus* identificadas por su metabolismo.

Bacterias	Gram	Mac	Mov	O	F	NO ₃ →NO ₂	VP	Cat	Ox	Cis	TRP	CIT	Gel	Indol	H ₂ S	ONPG	Glu	Sac	
						I←					API								→I
<i>Aeromonas</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-/+	-	
<i>Burkholderia</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-/+	-	
<i>Ochrobactrum</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Photobacterium</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	-	+	-/+	-	
<i>Pseudomonas</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Psychrobacter</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	
<i>Shewanella</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
<i>Sphingomonas</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
<i>Vibrio</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	

MacConkey (Mac), Movilidad (Mov), Oxidación (O), Fermentación (F), reducción de Nitratos a Nitritos (NO₃→NO₂), Voges-Proskauer (VP), Catalasa (Cat), Oxidasa (Ox), Cisteinasa (Cis), L-triptofano (TRP), Citrato trisódico (CIT), Gelatinasa (Gel), H₂O producción de sulfhídrico, β-galactosidasa (orto-nitrofenil-β-D-galactoprianosidasa (ONPG), Glucosa (Glu), Sacarosa (Sac), Positiva (+) y Negativa (-).

El género *Burkholderia* aislada del contenido intestinal del *P. corethrurus* con morfología de bacilos rectos, Gram negativos, móviles, aerobias y anaeróbicas, no fermentadores, aerobios y presencia del citocromo oxidasa (Cuadro 3.4). Ramette *et al.*, (2005) y Mahenthiralingam *et al.*, (2005) indican que son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien con un penacho de flagelos polares según las especies. También son mesófilos y no esporulantes. Su metabolismo es aerobio. Como sustancia de reserva utilizan el polihidroxi butirato. Son saprófitos que intervienen en el reciclaje de la materia orgánica. El género *Burkholderia* se reclasificó a partir del género *Pseudomonas* en función de los datos de ARNr. La especie tipo es *B. cepacia* (Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

El género *Ochrobactrum* aislada del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrurus* se observó Gram positivos, móviles, no fermentadores, aeróbicos, móviles, oxidasa positiva, producción de Indol (Cuadro 3.4). Gascón *et al.*, (2002) indican que forman parte de la microbiota del suelo, algunos pueden ser patógenos para animales.

El género *Sphingomonas* aislada del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrurus* de la forma de bacilos, Gram positivos, móviles, no fermentadores, aeróbicos, móviles, oxidasa positiva (Cuadro 3.4), comparado con *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, presenta mayor especificidad y velocidad de degradación frente a diferentes hidrocarburos aromáticos polinucleares, así como también se ha detectado su capacidad de producir bioemulsificantes (Adhya *et al.*, 1996).

El género *Pseudomonas* aislada del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrurus* son bacterias Gram-negativa, oxidasa positiva, aeróbicas, anaeróbica y algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones, triptofanasa negativa, y Voges Proskauer positivas (Cuadro 3.4). Williams y Wilkins (1994) indican que las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvos, no esporulados, cuyo tamaño oscila entre 0.5 y 1 μm de ancho por 1.5 y 4 μm de largo, no poseen vainas ni apéndices. Su metabolismo es respiratorio, nunca

fermentativo. Algunas especies son litotróficas pudiendo emplear la enzima cisteinasa, entre otros, como único donador de electrones. Asimismo pueden emplear el NO_3^- como aceptor de electrones en anaerobiosis. La prueba de oxidasa es generalmente positiva y catalasa lo es siempre (Williams y Wilkins, 1994). Son muy numerosas las publicaciones en las que se hace referencia a distintas *Pseudomonas sp.* capaces de sobrevivir e incluso degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, como pesticidas, diversos compuestos halogenados, e hidrocarburos derivados del petróleo (Williams y Wilkins, 1994).

El género *Vibrio* aislada del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrus* son bacterias Gram-positivas, no presenta la oxidasa, aeróbicas, anaeróbica y algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones, triptofanasa negativas, y Voges Proskauer positivas (Cuadro 3.4). Gary *et al.*, (2005) y Takahashi *et al.*, (2008) mencionan que la familia de Vibrionaceae contiene un grupo amplio de patógenos humanos y animales dentro de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Photobacterium*. Tsapin *et al.* (1996) indican que el género *Shewanella* bacteria gram-negativa tiene la capacidad de reducir anaeróbicamente el hierro y el manganeso. La flexibilidad respiratoria de *Shewanella putrefaciens* se atribuye al sistema de citocromos *c* del potencial redox (E°) y esta especie de bacteria puede considerarse como productora de sideróforos (Gram, 1994; Dale *et al.*, 2007).

La relación entre microorganismos y el oligoqueto no necesariamente se limita a un proceso de depredación, se ha demostrado que algunos microorganismos no son afectados significativamente por las enzimas digestivas producidas por las lombrices de tierra (Needham *et al.*, 2004) y que hay una activación de algunos de ellos (Barois y Lavelle, 1986).

Los generos *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Photobacterium* *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Sphingomonas* y *Vibrio* identificados en el contenido intestinal son aerobios que pueden ser de vida libre en el suelo, y algunos posibles de ser patógenos al hombre.

Frecuencia de las bacterias aisladas en el tracto digestivo *P. corethrurus*

En la Figura 3.4 se observó que la sección B presenta mayor porcentaje de frecuencia a comparación de las otras secciones A, C y D de las bacterias aisladas del contenido intestinal de *P. corethrurus* tanto en Plan de las Hayas y La Mancha. La sección A es la sección que contiene la boca, donde la lombriz inicia su alimentación, en la que no hay selección de los microorganismos, la sección B es la parte donde comienza la selección e incrementan las colonias bacterianas y las reacciones enzimáticas de parte de los microorganismos, la sección C siguió el proceso de la selección y va en disminución las bacterias durante el proceso de la degradación de la materia orgánica e inorgánica y en la sección D es la parte final del sistema digestivo, en la que se encuentra el ano, donde se forma el producto final o turrículo, el cual, contiene mucus, hongos, enzimas, y principalmente bacterias. Las secciones B y C forman la parte media del sistema digestivo, en donde puede haber una inhibición o selección de la microflora para degradar el sustrato orgánico e inorgánico. Singleton *et al.*, (2003) estudiaron las bacterias asociadas al intestino de *Lumbricus rubellus*, perteneciente a: *Acidobacteria*, *Firmicutes*, y β -*Proteobacteria*, sugieren que una pequeña cantidad de estos organismos dominaron la comunidad microbiana y están asociadas al intestino, las cuales son oportunistas y obligadas.

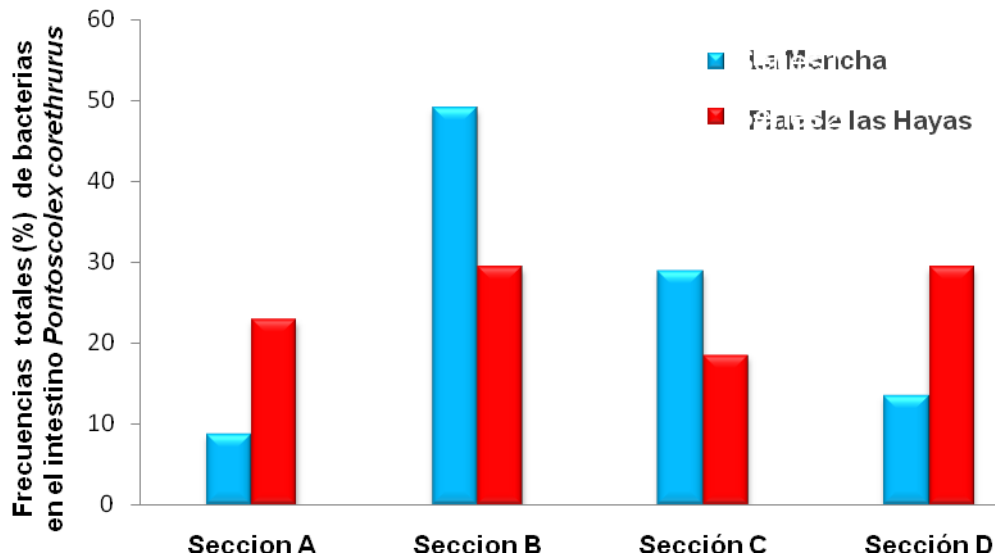


Figura 3.4. Frecuencias de las bacterias aisladas en las cuatro secciones del contenido intestinal *P. corethrurus* en las localidades de La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz.

Frecuencias de bacterias aisladas del tracto digestivo de *P. corethrurus*

En el Cuadro 3.5 se presentan las frecuencias de las bacterias de los géneros y especies aisladas de las cuatro secciones del contenido intestinal (A, B, C y D) de *P. corethrurus* de Plan de las Hayas y La Mancha. En *P. corethrurus* colectada de Plan de las Hayas, con suelo arcilloso, contenido de C 4 % , N 0.36 %, precipitaciones 800 mm anual y dedicado a la ganadería con pastizal se identificaron 9 géneros de bacterias y 13 especies diferentes: ***Aeromonas hydrophila/caviae*, *A. salmonicida ssp salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Vibrio parahaemolyticus***. En La Mancha, zona ecológica con plantación de banana, suelo arenoso, con un contenido de C 1 % , N 0.1 % y precipitaciones 1200 a 1500 mm anual, se identificaron 7 géneros y 9 bacterias de las cuatro secciones del sistema digestivo de *P. corethrurus*: ***Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*,**

***Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Shewanella putrefaciens* y *Sphingomonas paucimobilis*.**

Las bacterias *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia*, *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas luteola* presentaron mayor presencia (38, 29, 37 y 24, respectivamente) en el contenido intestinal de la lombriz en las localidades La Mancha y Plan de las Hayas (Cuadro 3.5). Las bacterias *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas luteola* están presentes en las cuatro secciones (A, B, C y D) en el tracto digestivo en los dos sitios de muestreo. *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Psychrobacter phenylpyruvicus* identificadas del sistema digestivo de *P. corethrurus* no estuvieron presentes en el contenido intestinal de las lombrices colectadas en el sitio La Mancha. El género *Pseudomonas* predominó en el sistema digestivo con cuatro especies en los dos sitios de colecta: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. luteola* (Cuadro 3.5). Es probable que el tipo, la composición de la materia orgánica del suelo y el ecosistema tengan influencia en la diversidad de la microflora bacteriana.

Cuadro 3.5. Frecuencia de las bacterias aisladas del tracto digestivo *P. corethrurus* en La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz.

Bacterias	Sección A		Sección B		Sección C		Sección D		Total
	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	3	1	18	5	5	5	-	1	38
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	-	2	-	-	-	1	-	2	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	2	11	5	8	1	-	2	29
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0	2	8	-	-	1	-	2	13
<i>Photobacterium damsela</i>	3	7	5	4	3	3	5	7	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	2	-	-	3	-	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	1	3	1	8	1	3	1	18
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	3	-	-	-	3
<i>Pseudomonas luteola</i>	3	2	3	7	3	1	3	2	24
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	-	4	-	1	-	-	-	4	9
<i>Shewanella putrefaciens group</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	3	1	-	3	-	-	7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Total	9	21	51	27	30	17	14	21	190

CONCLUSION

El número de UFC ss g⁻¹ presentó el mismo comportamiento en el contenido intestinal de *P. corethrurus* en ambos sitios de colecta. El número UFC (ss g⁻¹) va en aumento de la sección A hasta la sección B y disminuye de la sección C a la D. En la sección B es la sección con la mayor frecuencia bacteriana en el tracto de *P. corethrurus* en ambos sitios de muestreo. En el medio ABHI se observó en las secciones A, B, C y D el mayor número de UFC (ss g⁻¹) (39x10⁵, 45x10⁵, 50x10⁵ y 50x10⁵, respectivamente) a comparación de los otros medio de cultivo, en la zona de la Mancha presentando un tipo de suelo arenoso con contenidos de C 1 % y N 0.1 %. El medio PF de Plan de las Hayas presento el mayor número de UFC ss g⁻¹ en las cuatro secciones A, B, C y D del contenido intestinal (34x10⁵, 45x10⁵, 45x10⁵ y 34x10⁵, respectivamente) esto puede deberse al tipo de suelo arcilloso con un contenido mayor de C 1 % y N 0.36 % que La Mancha. Los medios de cultivo pueden ser que no fueron los más adecuados para aislar bacterias específicas del contenido intestinal de la lombriz endogea.

El relación a las reaccion enzimática y metabolismo de los nueve géneros de bacterias aislados del sistema digestivo de *P. corethrurus*: *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Shewanell*, *Sphingomonas* y *Vibrio* no todas presentaron algunas enzimas como la catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa, cisteinasa y la reducción de nitratos a nitritos. Estas enzimas están presentes en las bacterias y son ingeridas por la lombriz de tierra geófaga.

En Plan de las Hayas, que presenta suelo arcilloso con actividad ganadera se identificaron 9 géneros y 13 especies de bacterias: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *A. salmonicida ssp salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Vibrio parahaemolyticus*.

En la Mancha, una zona ecológica con suelo arenoso y plantación de banana fueron identificadas nueve géneros y especies de bacterias en el sistema digestivo de *P. corethrurus*: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Shewanella putrefaciens* y *Sphingomonas paucimobilis*. Se esperaba obtener una diversidad de bacterias aproximadamente de 91 a 95 (Hyun-Jung *et al.* 2004) del contenido intestinal de la lombriz de tierra y solo se obtuvo 13 generos de bacterias en *P. corethrurus*.

Las especies *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Psychrobacter phenylpyruvicus*, no se identificaron en los individuos de *P. corethrurus* en el sitio La Mancha. Por otro lado, dos bacterias *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas luteola* fueron las más frecuentes en las secciones A, B, C y D del tracto digestivo y el género *Pseudomonas* predominó con cuatro especies: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, y *P. luteola* en ambos sitios de la colecta. La sección que presentó menos especies fue la A y la que tuvo mas fue la B tanto para Plan de las Hayas como para La Mancha.

Los resultados indican que las lombrices de la especie *P. corethrurus* colectadas en Plan de las Hayas y La Mancha difieren en cuanto a su diversidad bacteriana. El contenido intestinal de Plan de las Hayas tiene una mayor diversidad pero en La Mancha hay ciertas bacterias que se desarrollan más como ***Aeromonas hydrophila/caviae*** y ***Burkholderia cepacia***. Es probable que el tipo y uso que se hace del suelo condicione la diferencia en la diversidad bacteriana. La catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa, cisteinasa estas enzimas presentes en las bacterias son ingeridas por la lombriz de tierra geófaga realizando un mutualismo anisosimbiótico.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico (becario 208219), a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT)

por su valioso contribución y apoyo en la formación científico, y al Colegio de Postgraduados como Institución en la estancia y desarrollo de la investigación a nivel Doctorado en Ciencias Agrícolas.

Referencias

- Adhya, T.K., Apte S.K., Raghu K., Sethunathan N., Murthy N.B.** 1996. Novel polypeptides induced for its biodegradation by a *Sphingomonas paucimobilis* strain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 (3): 755-61.
- Barois, I.** 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of to species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climate. *Soil. Biol. Biochem.* 24:1507-1510.
- Barois, I., Villemin G., Lavelle P., Toutain F.** 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolez corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma.* 56:57-66.
- Barois, I., Villemin G., Lavelle P., Toutain F.** 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Geoderma.* 56:57-66.
- Barois, I., Lavelle P.** 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18: 539–541.
- Barois, I.** 1987. Interaction entre les Vers de terre (Oligochaeta) tropicaux gèophages et la microflore pour l`exploitation de la matière organique du sol. Université d`ABIDJAN, Station d`Ecologie tropicale de LAMTO. No.7. BP 28 N`douci, Côte d`Ivoire.
- Bradshaw, L.J.** 1973. Microbiología de laboratorio. Edit. El manual moderno, S.A. de C.V. México.
- Byzov, B.A., Khomyakov N.V., Kharin S.A., Kurakov A.V.** 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of eartworms. *European Journal of Soil Biology.* 43:146-156.
- Cesar, I., Kingombe B., Jean-Yves D., Huys G., Hofmann L., Rao M., Kwan J.** 2010. Multiplex PCR Method for Detection of Three *Aeromonas* Enterotoxin Genes. *Appl. Envir. Microbiol.* 15 (76):425-433.
- Dale, J.R., Wade R.Jr., DiChristina T.J.** 2007. A Conserved Histidine in Cytochrome c Maturation Permease CcmB of *Shewanella putrefaciens* Is Required for Anaerobic Growth below a Threshold Standard Redox Potential. *Journal of Bacteriology.* 189 (3):1036–1043.
- De Leij, F.A.A.M., Sutton E.J., Whipps J.M., Lynch J.M.** 1994. Spread and survival of a genetically modified *Pseudomonas aureofaciens* in the phytosphere of wheat and in Soil. *Appl. Soil Ecol.* 1: 207-218.
- Eivazi, F., Tabatabai M.A.** 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry.* 9 (3):167-172.
- Freud, J., Walpole R.** 1990. Estadística Matemática con Aplicaciones. Cuarta edición, Prentice-Hall-Hispanoamericana. México.

- García J.A., Fragoso C.** 2003. Influencia of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*). *Pedobiologia*. 47:754-763.
- Gary P.R., Watson M.A., Parveen S.** 2005. Development of a Simple and Rapid Fluorogenic Procedure for Identification of *Vibrionaceae* Family Members. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3524–3527.
- Gascón, F., Zafra M.A., Castaño M.A., De la Cámara C., Valle M., Sánchez I.** 2002. Neumonía extrahospitalaria con bacteriemia por *Ochrobactrum anthropi* en un niño inmunocompetente. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 51 (2): 69-70.
- Gram, L.** 1994. Siderophore-Mediated Iron Sequestering by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 6: 2132-2136.
- Guwy, A.J., Martin S.R., Hawkes F.R., Hawkes D.L.** 1999. Catalase activity measurements in suspended aerobic biomass and soil samples. *Enzyme and Microbial Technology*. 25 (8-9):669-676.
- Hernández-García M.A., Granados-Sánchez D.** 2006. El parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan y el impacto ecológico-social de su deterioro. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12 (2):101-109.
- Horn, M. A., Schramm A., Drake H.L.** 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1662–1669.
- Huhta, V.** 2002. Soil macroarthropod communities in planted birch stands in comparison with natural forests in central Finland. *Applied Soil Ecology*. 20 (3):199-209.
- Hyun-Jung, K., Kwang-Hee S., Chang-Jun Ch, Hor-Gil H.** 2004. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47(3):137-142.
- Khosravi, D.K., Falahatpishe K., Jalali H.R.** 2008. Alkaline protease production on date waste by an alkalophilic *Bacillus sp.* 2-5 isolated from soil. *Afr. J. Biotechnol.* 7(10):1536-1542.
- Krišrtúek, V., Ravasz K., Pižl V.** 1992. Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry*. (24) 12:1499-1500.
- Lattaud, C., Locati S., Mora P., Rouland C., Lavelle P.** 1998. The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Applied Soil Ecology* 9:189-195.
- Lavelle P., Decaëns T., Aubert M., Barot M.S., Blouin F., Bureau P., Margerie P., Mora J., Rossi P.** 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*. 42(1):3-15.
- Lavelle, P., Barois I., Cruz I., Fragoso C., Hernandez A., Pineda A., Rangel P.** 1992. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biol Fertil Soils* 14:49-53.
- Lavelle, P., Barois I., Cruz I., Fragoso C., Hernandez A., Pineda A., Rangel P.** 1987. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae,

- Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biol Fertil Soils*.5:188-194.
- Lavelle, P., Lattaud C., Trigo D., Barois I.** 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and soil*. 170:23-33.
- MacFaddin, J.** 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Edit. Panamericana
- Mahenthiralingam, E., Urban T.A., Goldberg J.B.** 2005. The Multifarious, Multireplicon *Burkholderia Cepacia* Complex. *Nature Review Microbiol.* 3:144-156.
- Malcolm, R., Inder B.Jr, Saxena M.** 2000. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38 (1-2):57-67.
- Nannipieri, P. Grego S., Ceccanti B.** 1990. Ecological significance of biological activity in soil en: Bollag, J, Sttzky, G. (eds), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York. 293-355 p.
- O'Reilly, T., Day D.F.** 1983. Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol.* March; 45(3):1132-1135.
- Ramette, A., Lipuma J., Tiedje J.** 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol*; 71: 1193-201.
- Singleton, D.R., Hendrix P.F., Whitma W.B.** 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. 35 (12):1547-1555.
- Smith, T.D., Conant F.N., Beard W.J., Willett P.H., Overman R.J., Brown W.I., Sharp G.D., Poston A.M.** 1964. *Bacteriologia de Zinsser*. Edit., Hispano Americana. México.
- Soto, A., Zapardiel J., Soriano F.** 1994. Evaluation of API Coryne sistem for identifying coryneform bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 47:756-759.
- Takahashi, H., Miya S., Kimura B., Yamane K., Arakawa Y., Fujii T.** 2008. Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis* . 45, (2):150-158.
- Tsapin, A.I., Nealson K.H., Meyers T., Cusanovich M.A., Van Beuumen J., Crosby L.D., Feinberg B.A., Zhang C.** 1996. Purification and Properties of a Low-Redox-Potential Tetraheme Cytochrome *c3* from *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 178, 21: 6386–6388.
- Valle-Molinares, R., Borges S., Rios-Velazquez C.** 2007. Characterization of possible symbionts in *Onychochaeta borincana* (Annelida:Glossoscolecidae). *European Journal of Soil Biology*. 43:14-18.
- Walker, T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa- Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation*. *Plant Physiology* 134:320-331.
- Williams, W.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (Eds). Ninth Edition.
- Winding, A., Rohn R., Hendriksen N.B.** 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. *Biol. Fertil. Soils*. 24:133-140.

CAPITULO IV
USO DEL GEN 16S rDNA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LOMBRIZ DE
TIERRA *Pontoscolex corethrurus*

USE OF GEN 16 rDNA FOR CHARACTERIZATION OF BACTERIA THE INTESTINAL
CONTENT OF THE EARTHWORM *Pontoscolex corethrurus*

Brito-Vega Hortensia¹, Espinosa-Victoria David*², Barois Boullard Isabelle³, Gómez-Vázquez Armando¹, Lavelle Patrick⁴

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco. CP. 86000. Tels. +52 (993) 3581500 ext. 6602, 3581585 y 1429151, ²Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. De México.

³Instituto Ecología A.C., Jalapa, Veracruz. ⁴Laboratoire d'Ecologie des Sols Tropicaux, IRD/ Ile de France/Université Paris VI.

*despinos@colpos.mx

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética de las bacterias que habitan el contenido intestinal de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*. El muestreo de la especie *P. corethrurus* se realizó en dos localidades del estado de Veracruz, México: Plan de las Hayas, que soporta el pastoreo de ganado vacuno y La Mancha una zona ecológica de conservación con una parte destinada al cultivo de banana. El intestino fue dividido en cuatro secciones: (A) anterior, (B) media, (C) posterior y (D) final. Bajo condiciones asépticas, el contenido intestinal fue colocado en medio líquido Brain Heart Infusion (BHI), y después transferido a placas con medios de cultivo agar nutritivo, agar de soya tripticaseina, medio de King, *Pseudomonas* y agar BHI para aislar las bacterias. A los aislamientos puros se les extrajo el DNA y se llevó a cabo la amplificación 16rRNA, el cual se secuenció parcialmente con el propósito de identificar el género y la especie bacteriana. Se identificaron ocho géneros de bacterias: *Bacillus*, *Bacterium*, *Terribacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*,

Massilia, *Aeromonas* y *Citrococcus*. Los géneros *Aeromonas*, *Bacterium* y *Bacillus* están presentes en todas las secciones A, B, C y D del tracto digestivo de *P. corethrurus* en las zonas Plan de las Hayas y la Mancha. En el contenido intestinal de *P. corethrurus* el género *Terrabacillus* no está presente en la zona Plan de las Hayas y los géneros *Pseudomonas*, *Massilia*, *Acinetobacter* y *Citrococcus* no están presentes en La Mancha, Veracruz. El género que predominó fue *Bacillus* con cinco especies en *P. corethrurus*: *Bacillus megaterium*, *B. horikoshii*, *B. mycoides*, *B. subtilis* subsp. *Subtilis* y *B. cereus*.

Palabras claves: secuencia, amplificación, DNA, *Pseudomonas*, *Aeromonas*

INTRODUCCIÓN

En el ámbito de la producción agrícola es cada vez más exigente el mercado nacional y mundial, esto ha llevado a una sobreexplotación exhaustiva del suelo. La utilización de un mismo cultivo, la aplicación excesiva de fertilizantes, insecticidas y plaguicidas durante muchos años en el mismo lugar y la deforestación de los bosques y selvas va en aumento y esto ha causado desaparición de organismos principalmente del suelo, que pueden causar enfermedades o beneficios a las plantas (Ristaino y Thomas, 1997). Uno de los problemas que origina la devastación de los ecosistemas es la disminución o extinción de la biodiversidad. El suelo es un ecosistema, en el que se encuentran macroorganismos (lombrices de tierra, hormigas y termitas) y microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios). Estos microorganismos son ingeridos por los invertebrados realizando una anisosimbiosis, para así degradar los compuestos orgánicos por medio de las enzimas (Lavelle *et al.*, 1995; Lattaud *et al.*, 1998). Parece que la lombriz de tierra no posee enzimas para digerir directamente la celulosa, lignina, taninos y complejos húmicos en cambio estas enzimas están presentes en la microflora (Lavelle *et al.*, 1995; Lattaud *et al.*, 1998). La participación de los microorganismos en el tracto digestivo de la lombriz es de gran importancia ya que muchos de estos están involucrados en el proceso de degradación de la materia orgánica (Byzov *et al.*, 2007; Valle-Molinas *et al.*, 2007; Singleton *et al.*,

2003; Lavelle *et al.*, 1995). Para el estudio de las bacterias en el intestino de la lombriz, se han usado diversos métodos y técnicas como PCR-16S rDNA, la técnica de hibridación *in situ* fluorescente y 16sRNA que han ayudado a identificar especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Enterobacter* (Valle-Molinias *et al.*, 2007; Byzov *et al.*, 2007; Singleton *et al.*, 2003; Hyung-Jung *et al.*, 2004). Estas bacterias son en su mayoría bacterias promotoras del crecimiento vegetal, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fosfatos. Algunos autores han indicado la existencia de un posible tipo de mutualismo entre estos dos organismos (Valle-Molinares *et al.*, 2007; Lavelle y Spain, 2001; Barois y Lavelle, 1986). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue trabajar con el uso del gen 16S rRNA en la caracterización genética de bacterias del tracto digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de colecta

La colecta especies *P. corethrurus* se realizó en dos zonas del estado de Veracruz Plan de las Hayas y La Mancha (Cuadro 3.1):

1. Plan de las Hayas, Veracruz ubicada en las coordenadas 18° 27' latitud norte y 96° 21' longitud oeste a una altura de 860 metros sobre el nivel del mar, sus recursos naturales son el forestal, el agrícola y el ganadero; el tipo de suelo es un vertisol con textura arcillosa; su temperatura media anual es de 18° C y posee un clima templado húmedo semifrío; con una precipitación pluvial media anual de 1,509.1 mm (Barois, 1987).
2. La Mancha está ubicada al noroeste de ciudad de Cardel en el municipio de Actopan, sus coordenadas son 96° 22' de longitud oeste y 19° 36' latitud norte. La Mancha es una zona de conservación de fauna y flora, y con una plantación de banana. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación oscila entre 1200 y 1500 mm anuales. El suelo es un regosol pobre en materia orgánica y arenoso, y la temperatura media anual varía entre 22° C y 26° C (Barois, 1987).

Cuadro 4.1. Características generales de los dos sitios de muestreo, La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz (Barois *et al.* 1999; Barois 1987).

Sitio de estudio	La Mancha	Plan de las Hayas
Ecosistema	Acahual	Pastizal
Vegetación	Selva media subcaducifolia	Selva media
Altitud (msnm)	Nivel del mar	850
Temperatura	18 – 22 °C	22 °C
Precipitación	1200 – 1500 mm	800 mm
Sustrato	Arenosol cámbico	Vertisol éutrico
C	1%	4%
N	0.1%	0.36%
Textura	arenosa	arcillosa
Capacidad de campo	10%	35%

La caracterización de la microflora intestinal

Caracterizar las bacterias tuvo un diseño trifactorial con los siguientes niveles: el Factor 1) tiene dos niveles siendo 2 tipos de suelo el de Plan de las Hayas (PH) y La Mancha (M), el Factor 2) tiene 4 niveles que corresponden a las secciones del intestino: A, B, C y D. y el Factor 3) tiene 5 niveles que son los medios selectivos para bacterias: agar nutritivo (AN), agar de soya tripticaseina (AST) medio de King (MKA), *Pseudomonas* (PF) y agar ABHI con cuatro repeticiones, respectivamente.

Fijación de la lombriz de tierra

Se seleccionaron 20 individuos adultos de *P. corethrurus*, los cuales se lavaron con agua destilada para que quedaran libres del suelo externamente y uno por uno se sumergieron para tres lavados en etanol 70 % entre 10 a 30 s; posteriormente en agua destilada-estéril a una temperatura de 50° C por 10 s (Hyun-Jung *et al.*, 2004). Este paso fue muy importante, porque tiene como objetivo el de no matar a las bacterias del sistema digestivo. Para extraer el contenido intestinal el cuerpo de la lombriz de tierra fue diseccionado a todo lo largo hasta llegar al intestino donde se dividió en las cuatro secciones: (A) segmentos 1 al 35, (B) segmentos 36 al 69, (C) segmentos 70 al 101 y (D) segmentos 102 al 135, (ver la Figura 3.1.)

Aislamiento y purificación de bacterias

El aislamiento y purificación de las bacterias del contenido intestinal de *P. corethrurus* se efectuó colocando aproximadamente 1 g del sustrato húmedo de los contenidos intestinales de tres lombrices, aproximadamente, por regiones A, B, C y D en un tubo para obtener la dilución 10^{-1} o solución madre en medio líquido Brain Heart Infusion (BHI) DIFCO®; este medio líquido es adecuado para enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias y anaerobias, y difícil desarrollo. Posteriormente de esta dilución 10^{-1} se realizaron las diluciones sucesivas hasta 10^{-9} de cada sección (A, B, C y D). Las diluciones de 10^{-4} hasta la 10^{-9} fueron sembradas en placa (caja Pétri), agar nutritivo (AN) para aislamiento de bacterias poco exigentes en requerimientos nutritivos y no contiene inhibidores del desarrollo bacteriano, agar de soya tripticaseína (AST) provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, y fuente de nitrógeno y minerales, medio de B King (MKA) y *Pseudomonas* (PF) son medios para la detección y diferenciación de especies del género *Pseudomonas* spp., en base a la producción de fluoresceína y agar ABHI. Por cada dilución se hicieron tres repeticiones por cada medio de cultivo y las Placas se incubaron por 24 h a 30 °C. Al mismo tiempo, se procedió al aislamiento y purificación de las colonias de bacterias (Horn *et al.*, 2003; Hyun-Jung *et al.* 2004; Valle-Molinas *et al.*, 2007).

Posteriormente, se seleccionó las colonias de la dilución 10^{-5} , por que fue donde se presentó un número de colonias representativas y bien aisladas, para obtener cepas puras de los medios de cultivo selectivo AN, AST, MKA, PF y ABHI. Las placas inoculadas se incubaron a 30° C durante 24 h, después se verificó la pureza de los aislamientos, si no lo eran, se volvían a resembrar las colonias de bacterias en placas con su medio respectivo, hasta obtener colonias de bacterias puras.

ADN bacteriano con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se cultivó cada una de las cepas bacteriana aisladas y puras en placas con agar nutritivo a 32° C por 24 h para la extracción de ADN bacteriano. Posteriormente, se tomó una porción de la colonia de 10 µl aproximadamente y se colocó en tubos

Eppendorf® con 30 µl de la solución lisis (Tritón, SDS, NaCl, Tris-HCl y Proteínasa K). La muestra se colocó en un termociclador modelo *Biorad DNA Engine PCR System PIC200* Peltier Thermal (México). El programa comprende 1 ciclo a 95° C durante 5 min y se prosiguió a la centrifugación a 5000 rpm por 1 min. Tomar 5 µl de ADN bacteriano se adicionó en una dilución (1:5) en agua libres de RNasas (Silva, 2009).

Amplificación del gen 16S rARN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Biorad DNA Engine PCR System PIC200 Peltier Thermal. Se amplificó la región del gen 16S ribosomal del ADN extraído de las cepas bacterianas. Se utilizaron los primer universales 8F-forward (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R reverse (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) (Vickerman *et al.*, 2007). Así como las indicaciones de la preparación del mix, 5 µl del tampón para PCR (X10) (promega ®), 1µl de la mezcla de nucleótidos 10 mM (promega ®), 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM (promega ®), 0.5 µM de cada primer (promega ®), 2.5 U enzima taq polimerasa (promega®) y 5 µl del ADN extraído de las bacterias aisladas del tracto digestivo de la lombriz de tierra, hasta conseguir un volumen final de reacción 25 µl (Vickerman *et al.*, 2007). El programa de amplificación comprendió un ciclo de predesnaturalización a 94° C, por 3 min, 35 ciclos de amplificación consiste en desnatulización a 94° C, por 1 min; alineamiento a 55° C por 1 min y extensión a 72° C por 2 min y un último ciclo de elongación final a 72° C por 5 min (Silva, 2009; Vickerman *et al.*, 2007). Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa 0.8 %, debido al tamaño de los fragmentos a separar (Vickerman *et al.*, 2007; Aaij y Borst, 1972).

La agarosa fue gelificada en tampón TAE1X (Tris 242g/L, EDTA 0.05M pH 8, ácido acético glacial 57.1 ml/l). Para visualizar el ADN amplificado, se añadió al gel bromuro de etidio (agente intercalante), a una concentración 0.5 µg/ml (Maniatis y Col., 1982; Janssen, 2006). Las muestras de ADN amplificado se mezclaron, en una proporción 1/5 del volumen total con tampón de muestras X6 (sacarosa 40 %, azul de bromofenol 0,25 %). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales Mini de Maxicel® Primo EC340 Electrophoretic Gel System aplicando un voltage de 5-10 V/cm (Valadez y Kahl,

2000; Aaij y Borst, 1972). Los geles se observaron y/o fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm) (InfinityCap-3026 X-Press Vilbert Lourmat).

Secuenciación de ADN

Los productos de la amplificación del gen 16S rARN fueron secuenciados por la empresa MACRO GEN USA (<http://www.macrogenusa.com/>). Los procedimientos actuales solo pueden secuenciar directamente fragmentos relativamente cortos (300-1000 nucleótidos de longitud) en una sola reacción (Thompson *et al.* 1997).

Análisis filogenético

La secuencia obtenida se trabajó simultáneamente con secuencias en su alineación de otras cepas bacteriana en el GenBank. Las herramientas de software utilizadas para alineamiento de secuencias fueron [BLAST](#) ([NCBI](#) [EBI](#) [DDBJ](#) [DDBJ](#) ([psi-blast](#)) [GenomeNet](#) [PIR](#)) para búsquedas en bases de datos. Dicho alineamiento se llevó a cabo con el programa MEGA 4 (FASTA). El estudio descriptivo de las secuencias y reconstrucciones filogenéticas se basó en distancias genéticas y máxima parsimonia (Kirschner y Bottger, 2000; Tamura *et al.*, 2007).

Frecuencias de las bacterias

Las frecuencias se determinó considerando el número de veces que aparece una bacteria de un mismo taxón en las secciones (A, B, C y D) del tracto digestivo de *P. corethrurus* aisladas de Plan de las Hayas y La Mancha (Freud y Walpole, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Amplificación del gen 16s rARN

En la Figura 4.2 se presenta los productos de amplificación del gen 16s rADN de bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus*, del 1 al 16 corresponde a la zona La Mancha y del 17 al 34 a Plan de las Hayas, respectivamente. En total fueron 34 cepas bacterianas de las 190 colonias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra, fueron elegidas por la

diferencia morfológica y metabólicamente enzimática de cada bacteria, de las que se pudieron amplificar en el termociclador. Se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 1500 pb.

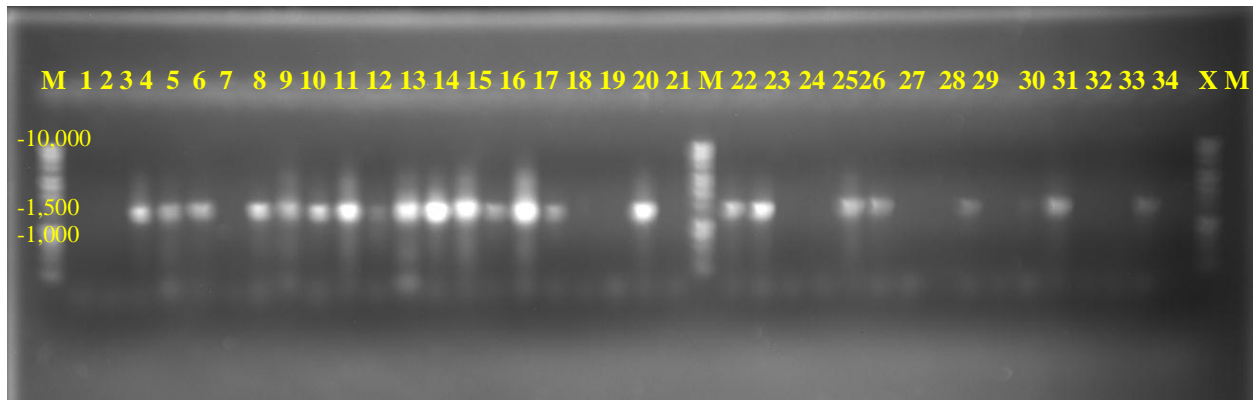


Figura 4.2. Productos de amplificación del gen 16S rARN de bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrus* 1-34, aislamiento bacteriano; X, control, M, marcador de peso molecular 1kb.

Análisis de las secuencias parciales del gen 16S rADN

La secuencia del gen 16S rADN de las bacterias aisladas en el contenido intestinal de *P. corethrus* de La Mancha y Plan de las Hayas se reportan en el Anexo A. La secuencia del gen 16S rADN de las cepas en estudio, muestra una diversidad genética de las poblaciones en estudio, es decir, no hay grupos de bacterias con el mismo patrón filogenético y están cercanos algunos géneros de bacterias. El gen 16S rARN permite inferir las relaciones filogenéticas entre organismos cercanos y distantes (Janssen, 2006).

Alineamiento de las secuencias

En el alineamiento de las secuencias parciales del gen 16S rARN en el blast del genbank fueron identificadas un total de ocho géneros y 8 especies de las bacterias aisladas del contenido intestinal de *P. corethrus* (Cuadro 4.2).

Las secuencias del gen 16S rARN parcial de las cepas bacterianas de La Mancha que corresponde a **Bacillus**, **B. megaterium** y **Aeromonas punctata** tienen aproximadamente 87 % de identidad en promedio. A comparación en Plan de las Hayas las secuencias del gen 16S rARN parcial de las cepas bacterianas que corresponden a *Acinetobacter sp.*, y *Bacillus cereus*, tienen aproximadamente 85 y 97 % de identidad, este porcentaje de identidad obtenido de cada una de las cepas bacterianas, significa que la alineación de la secuencia reportada es cercana y confiable a la identificación de la secuencia de la bacteria a nivel genético en el genbank, respectivamente.

Frecuencia de las bacterias aisladas de *P. corethrurus*

En el Cuadro 4.3 se presentan las frecuencias de las bacterias aisladas en el contenido intestinal de *P. corethrurus* de La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz, México. Se identificaron cuatro géneros de bacterias en La Mancha: **Bacillus**, **Terribacillus**, **Bacterium** y **Aeromonas**; y siete géneros de bacterias: **Bacillus**, **Bacterium**, **Pseudomonas**, **Acinetobacter**, **Massilia**, **Aeromonas** y **Citrococcus** en Plan de las Hayas. El género que predominó fue **Bacillus** con cinco especies en las secciones A, B, C y D del contenido intestinal de *P. corethrurus* tanto en La Mancha y Plan de las Hayas: *Bacillus megaterium*, *B. horikoshii*, *B. mycoides*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* y *B. cereus*, estas son bacterias habitas del suelo. Por otro lado, los autores Valle-Molinares *et al.* (2007) identificaron por amplificación 16s rRNA y microscopia electrónica en el intestino de *Onychochaeta borincana* siete especies de bacterias perteneciente al género *Bacillus* (*B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* y *B. pabuli*), todas estas especies típicas del suelo.

Cuadro 4.2. Alineamiento de las bases nucleotídicas de las secuencias parciales del Gen 16S rARN de los aislamientos bacterianos del contenido intestinal de *P. corethrurus* en el GenBank.

Bacteria	GenBank	% Identidad	Número de nucleótidos
La Mancha			
<i>Bacillus sp.</i>	EF428972.1	86	860
<i>Bacillus megaterium</i>	GQ504713.1	98	870
<i>Bacillus megaterium</i>	EF532904.1	83	683
<i>Aeromonas punctata</i>	FJ940812.1	87	673
<i>Bacterium Te35R</i>	AY587817.1	99	868
<i>Terribacillus sp. WPCB002</i>	FJ006860.1	99	857
<i>Bacillus sp. NQ-11/A2</i>	FJ392860.2	100	1249
<i>Bacillus sp.</i>	FJ227531.1	98	1293
<i>Bacillus sp. TSH80</i>	AB508868.1	99	858
<i>Bacillus sp. JSK1</i>	GQ527159.1	99	865
<i>Bacterium K21A</i>	AY345432.1	99	869
<i>Bacillus horikoshii</i>	GQ304778.1	98	872
No hubo reporté de secuencia			
Plan de Hayas			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FJ919563.1	98	870
<i>Massilia timonae</i>	AY157761.1	98	846
<i>Bacterium Te22R</i>	AY587809.1	99	1227
<i>Acinetobacter sp. BBI8</i>	GQ868354.1	97	859
<i>Citrococcus sp. FIB146_2</i>	EU308315.1	99	858
<i>Bacillus sp. NQ-11/A2</i>	FJ392860.2	98	873
<i>Bacillus sp. GPTSA100-8</i>	DQ854983.1	99	853
<i>Aeromonas sp. EO-0505</i>	FM999970.1	99	853
<i>Bacillus mycoides</i>	GQ344802.1	100	866
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	GQ375229.1	99	872
<i>Pseudomonas sp. MI-o1</i>	DQ180954.1	99	853
<i>Bacillus sp. DCR_C13</i>	FJ535580.1	99	868
<i>Bacillus cereus</i>	GQ342295.1	85	859
<i>Aeromonas sp. EO-0505</i>	FM999970.1	98	867
No hubo reporté de secuencia			

Cuadro 4.2. Frecuencia de las bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrurus* en La Mancha y Plan de las Hayas, Veracruz.

Bacterias	Sección A		Sección B		Sección C		Sección D		Total
	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	La Mancha	Plan de las Hayas	
<i>Acinetobacter sp. BBI8</i>	-	2	-	-	-	1	-	-	3
<i>Aeromonas punctata</i>	3	-	5	-	3	-	5	-	16
<i>Aeromonas sp. EO-0505</i>	-	7	-	4	-	3	-	7	21
<i>Aeromonas sp. EO-0505</i>	-	-	-	-	-	0	-	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	1	-	1	2
<i>Bacillus horikoshii</i>	-	-	8	-	-	-	-	-	8
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	11	-	8	-	-	-	19
<i>Bacillus mycoides</i>	-	4	-	1	-	-	-	-	5
<i>Bacillus sp.</i>	3	1	19	1	10	1	3	3	40
<i>Bacillus sp. DCR_C13</i>	-	-	-	1	-	3	-	3	7
<i>Bacillus sp. JSK1</i>	3	-	3	-	3	-	3	-	12
<i>Bacillus sp. TSH80</i>	-	-	3	-	-	-	-	-	3
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	-	2	-	7	-	1	-	5	15
<i>Bacterium Te22R</i>	-	2	-	5	-	1	3	4	15
<i>Citrococcus sp. FIB146_2</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>Massilia timonae</i>	-	2	-	-	-	1	-	-	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1	-	5	-	5	-	3	14
<i>Pseudomonas sp. MI-o1</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Terribacillus sp. WPCB002</i>	-	-	-	-	3	-	-	-	3
Riqueza de especies por sección	3	8	6	9	5	9	4	8	
Total	9	21	51	27	30	17	14	21	190

La presencia de la bacteria *Bacillus sp* predominó en la secciones A, B, C y D del tracto digestivo *P. corethrurus* en La Mancha y Plan de las Hayas (Cuadro 4.2). Las frecuencias de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sp.*, y *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* predominarán en las cuatro secciones (A, B, C y D) del tracto digestivo en Plan de las Hayas con un total de 14, 21 y 15, respectivamente (Cuadro 4.2).

En La Mancha están presentes las bacterias *Aeromonas punctata* y *Bacillus sp* en las cuatro secciones del tracto digestivo de *P. corethrurus* con un presencia total de 16 y 12, respectivamente. Hyun-Jung *et al.*, (2004) determinó por PCR-16sDNA la identificación de bacterias en el sistema digestivo de la especie *Eisenia fetida* proveniente de suelo contaminado de una zona industrial y observó el crecimiento de 91 colonias de las cuales se dividieron en 12 grupos: *Aeromonas* 6 %, *Agromyces* 3 %, *Bacillus* 31 %, *Bosea* 1 %, *Gordonia* 6 %, *Klebsiella* 6 %, *Microbacterium* 7%, *Nocardia* 2%, *Pseudomonas* 10 %, *Rhodococcus* 19 %, *Tsukamurella* y *Streptomyces* 7%. El género *Bacillus* fue el grupo con mayor dominancia en el intestino de la lombriz y la diversidad de bacterias obtenidas es menor reportada por los investigadores, se esperaba una similar o mayor diversidad de bacterias en las dos zonas de estudio, esto puede deberse a los medio de cultivos son selectivos para ciertas bacterias específicas.

Los géneros *Aeromonas*, *Bacterium* y *Bacillus* estan presentes en las cuatro secciones del tracto digestivo de *P. corethrurus* en las zonas Plan de las Hayas y La Mancha. En el sistema digestivo de *P. corethrurus* el género *Terrabacillus* no esta presente en Plan de las Hayas y los géneros *Pseudomonas*, *Massilia*, *Acinetobacter* y *Citrococcus* no están presentes en La Mancha, Veracruz.

Construccion de dendrograma

Las secuencias obtenidas (perfil genómico) fueron usados para generar una matriz de datos con la que se contruyó un dendrograma para poder determinar los grupos de bacterias genéticamente similares. El análisis indica que existe diversidad de bacterias

en el tracto digestivo de *P. corethrurus* de Plan de las Hayas y La Mancha con 10 ramas con máximo parsimonió (Figuras 4.3).

Los patrones de bandeo obtenido (perfil genómico) fueron usados para generar una matriz de datos con la que se contruyó un dendrograma para poder determinar los grupos genéticamente similares. El análisis indica que existe una diversidad de bacterias en las dos zonas La Mancha y Plan de Hayas, se observan grupos con distancias de similitud, lo que indica que estas cepas pertenecen a diferentes taxón (Figuras 4.4 y 4.5).

En la Figura 4.5 el dendrograma muestra el perfil genética que existe en 12 cepas de bacterias aisladas del tracto digestivo de la lombriz de tierra *P. corethrurus* de la zona de Plan de las Hayas, construido con las secuencias parciales de gen16S rADN amplificado por PCR, presentó por lo menos cinco diferentes ramas, lo cual indica que las bacterias no pertenecen al mismo taxón. Una de las ramas es del género de *Pseudomonas*, la cual ha sido identificada por los investigadores como Horn *et al.*, (2006) quienes determinaron la filogenia con la secuencia “*nosZ*” para bacterias reductoras de oxido nitroso (N₂O) en los sistemas digestivos de las lombrices de tierra: *Aporrectodea caliginosa* (Savigny), *Allolobophora chlorotica* (Savigny), *Lumbricus terrestris* L., y *Lumbricus rubellus* se identificaron los géneros *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Dechloromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, y *Sinorhizobium*.

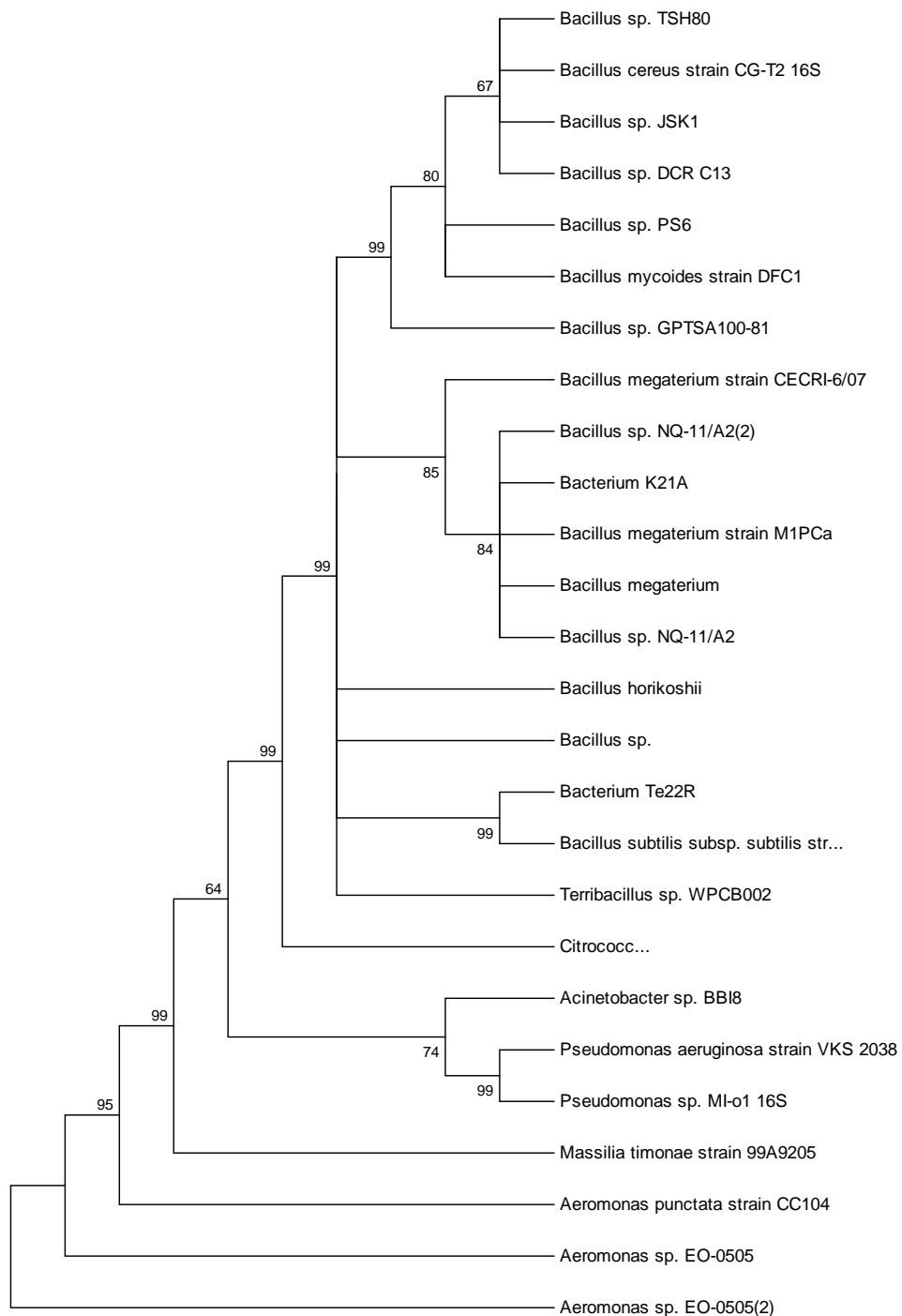


Figura 4.3. Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrus* construido con las secuencias parciales de gen16S rARN amplificado por PCR.

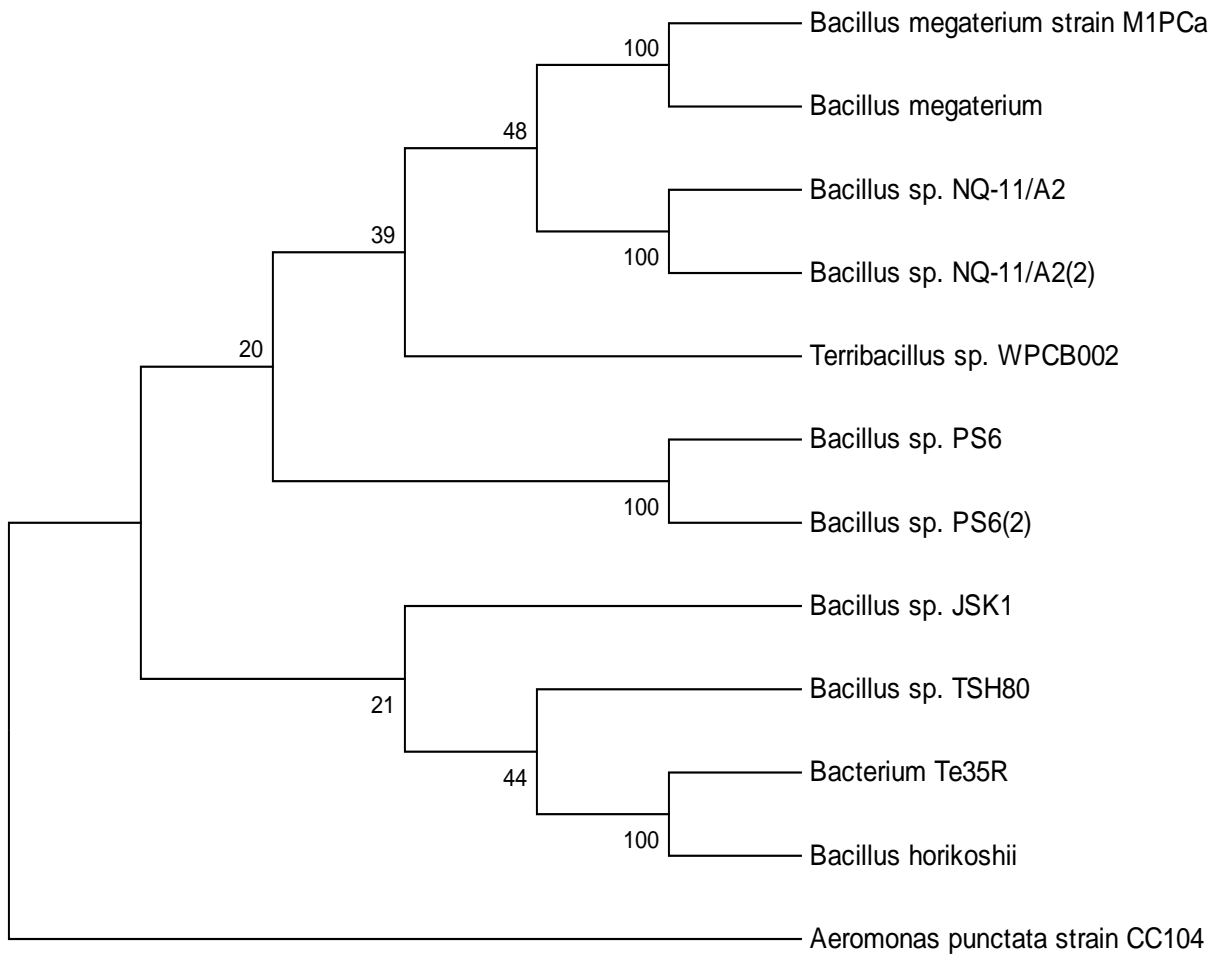


Figura 4.4. Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrus* de la zona de La Mancha, construido con las secuencias parciales de gen16S rARN amplificado por PCR.

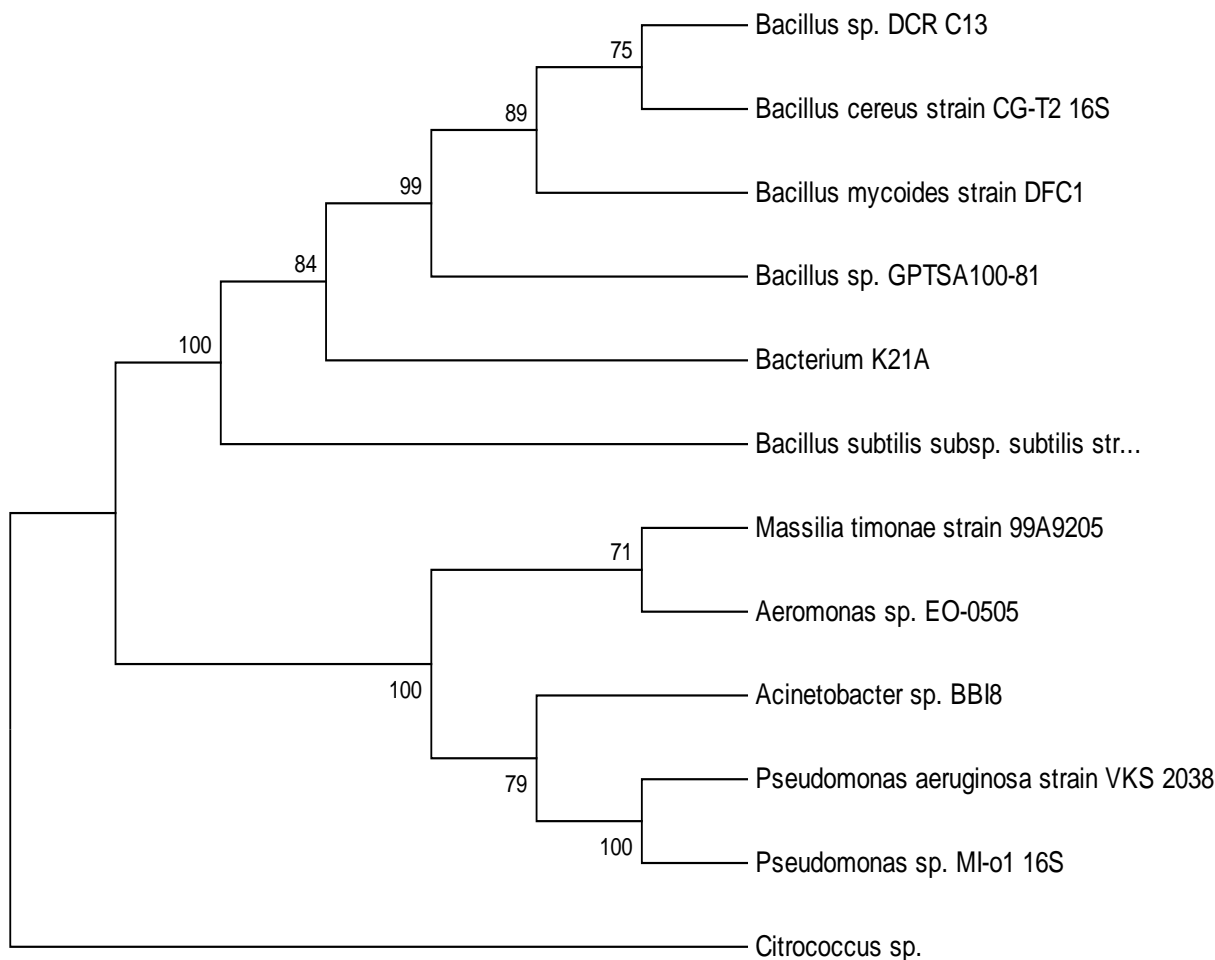


Figura 4.5. Dendrograma filogenético de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrus* de la zona de Plan de las Hayas, construido con las secuencias parciales de gen16S rADN amplificado por PCR.

CONCLUSION

Se identificaron cuatro géneros de bacterias en el contenido intestinal de *P. corethrus* aisladas de La Mancha (*Bacillus*, *Terribacillus*, *Bacterium* y *Aeromonas*) y siete géneros en Plan de las Hayas (*Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Massilia*, *Aeromonas* y *Citrococcus*), algunas bacterias son típicas del suelo y se puede considerar algunas propias del intestino de la lombriz. De las cuales las bacterias el género *Terrabacillus* no esta presente en Plan de las Hayas y los

géneros *Pseudomonas*, *Massilia*, *Acinetobacter* y *Citrococcus* no están presentes en la Mancha, Veracruz. El género *Bacillus* sp predominó en la secciones A, B, C y D del tracto digestivo *P. corethrurus* en La Mancha y Plan de las Hayas. En ambos sitios se observa diferencias filogenético en los géneros de las bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrurus*. Estas diferencias se pueden deber al tipo y manejo del suelo, La Mancha es un sitio que presenta un suelo arenoso, mientras que Plan de las Hayas es un suelo arcilloso que esta bajo pastoreo. La diversidad filogenética demuestra que es importante realizar la clonación y secuenciación del gen 16S rDNA de las cepas faltantes por técnicas no cultivables (metagenómica) para lograr una correcta clasificación taxonómica.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico (becario 208219), a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por su valioso contribución y apoyo en la formación científica, y al Colegio de Postgraduados como Institución en la estancia y desarrollo de la investigación a nivel Doctorado en Ciencias Agrícolas.

Referencias

- Aaij, C., Borst P.** 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192–200.
- Barois, I.** 1987. Interaction entre les Vers de terre (Oligochaeta) tropicaux géophages et la microflore pour l'exploitation de la matiere organique du sol. Université d'Abidjan. Station d'Ecologie tropicale de LAMTO.
- Barois, I.** 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of to species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climate. *Soil. Biol. Biochem.* 24:1507-1510.
- Barois, I., Lavelle P.** 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18: 539–541.
- Byzov, B.A., Khomyakov N.V., Kharin S.A., Kurakov A.V.** 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of eartworms. *European Journal of Soil Biology.* 43:146-156.
- Freud, J., Walpole, R.** 1990. Estadística Matemática con Aplicaciones. Cuarta edición, Prentice-Hall-Hispanoamericana. México.
- Horn, M.A., Drake L.H., Schramm A.** 2006. Nitrous Oxide Reductase Genes (*nosZ*) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are

- Phylogenetically Similar. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2):1019–1026.
- Horn, M. A., Schramm A., Drake H.L.** 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1662–1669.
- Huhta, V.** 2002. Soil macroarthropod communities in planted birch stands in comparison with natural forests in central Finland. *Applied Soil Ecology*. 20 (3):199-209. DOI: 10.1016/S0929-1393(02)00021-5.
- Hyun-Jung, K., Kwang-Hee S., Chang-Jun Ch, Hor-Gil H.** 2004. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47 (3):137-142.
- Janssen, P.H.** 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *American Society for Microbiology*. 3:1719–1728.
- Kirschner, P., Bottger E.C.** 2000. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. *Methods Mol Biol*; 101:349-61.
- Lavelle P., Lattaud C., Trigo D., Barois I.** 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* 170: 23-33.
- Ristaino, J.B., Thomas W.** 1997. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps? *Plant Disease* 81:964-977.
- Singleton, D.R., Hendrix P.F., Whitma W.B.** 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. (35) 12:1547-1555.
- Tamura, K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24:1596-9.
- Thompson, J. D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.** 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Valadez, M. E., Kahl, G.** 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. P.47-55.
- Valle-Molinares, R., Borges S., Rios-Velazquez C.** 2007. Characterization of possible symbionts in *Onychochaeta borincana* (Annelida:Glossoscolecidae). *European Journal of Soil Biology*. 43:14-18.
- Vickerman, M.M., Brossard K.A., Funk D. B., Jesionowski A.M. Gill S.R.** 2007. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 110–118.

Conclusión general

En el sistema digestivo de la lombriz de tierra *Pontoscolex corethrurus* se observó que las poblaciones bacterianas presentan similar comportamiento en ambas localidades (Plan de las Hayas y La Mancha): aumento de las poblaciones en la sección B, que es la parte de la selección y el comienzo de la degradación del sustrato orgánico e inorgánico y los microorganismos participan en este proceso en el tracto digestivo de la lombriz.

En las secciones A, B, C y D del sistema digestivo de la lombriz de tierra *P. corethrurus* se observó diversidad bacteriana. Los géneros que predominaron fueron *Bacillus*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, con especies típicas del suelo. En Plan de las Hayas fueron identificadas con el sistema API® 9 géneros y 13 especies de bacterias: ***Aeromonas hydrophila/caviae***, *A. salmonicida ssp salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Photobacterium damsela*, ***Pseudomonas aeruginosa***, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Vibrio parahaemolyticus*. En La Mancha fueron identificadas 7 géneros y 10 especies de bacterias en el sistema digestivo de *P. corethrurus*: ***Aeromonas hydrophila/caviae***, ***Burkholderia cepacia***, ***Ochrobactrum anthropi***, ***Photobacterium damsela***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***P. fluorescens***, ***P. putida***, ***P. luteola***, ***Shewanella putrefaciens*** y ***Sphingomonas paucimobilis***.

Con el uso de la secuenciación del gen 16S rARN de las bacterias aisladas del contenido intestinal de la lombriz de tierra *P. corethrurus* se identificaron siete géneros en Plan de las Hayas (*Bacillus*, *Bacterium*, ***Pseudomonas***, *Acinetobacter*, *Massilia*, ***Aeromonas*** y *Citrococcus*) y cuatro (*Bacillus*, *Terribacillus*, *Bacterium* y ***Aeromonas***) en la Mancha.

Se considera que el limitado número de aislamientos estudiados no permite establecer una clara relación entre las variantes de reacciones enzimáticas con el sistema API®. El empleo de pruebas metabólicas adicionales y la amplificación de la región 16s rARN de

bacterias no cultivables permitirá discriminar a nivel de especies para mejorar el diagnóstico bacteriológico. Con ambas técnicas empleadas se identificaron los géneros ***Aeromonas*** y ***Pseudomonas***, pero difirieron con la presencia de otros géneros.

En ambos sitios se observó diferencias filogenéticas entre los géneros de las bacterias aisladas del contenido intestinal *P. corethrurus*. Estas diferencias se puede deber al tipo de suelo, contenido de C 4 %, N 0.36 % en Plan de las Hayas y el contenido de C 1 %, N 0.1 % en La Mancha y tal vez también a su manejo. La Mancha es un sitio de reserva ecológica que presenta un suelo arenoso, mientras que Plan de las Hayas es un suelo arcilloso que esta bajo forraje y pastoreo de ganado bovino.

La diversidad filogenética demuestra que es importante realizar la clonación y secuenciación del gen 16S rARN de las cepas bacterianas aisladas del sistema digestivo de la lombriz de tierra y las faltantes para lograr una correcta clasificación taxonómica.

La especie *P. corethrurus* colectadas en Plan de las Hayas y La Mancha difieren en cuanto a su diversidad bacteriana del tracto digestivo. El contenido intestinal de Plan de las Hayas tiene una diferencia de diversidad, pero en La Mancha hay ciertas bacterias que se desarrollan más como ***Aeromonas hydrophila/caviae*** y ***Burkholderia cepacia***. Es probable que el tipo y uso que se hace del suelo condicione la diferencia en la diversidad bacteriana.

Las enzimas catalasa, oxidasa, gelatinasa, citratasa, triptofanasa, cisteinasa, enzimas presentes en las bacterias que son ingeridas junto con el suelo por la lombriz de tierra geófaga, establecen un mutualismo anisosimbiótico (paradigma de la bella durmiente). Esta diversidad y la interacción con las bacterias en el tracto digestivo de *P. corethrurus*, contribuyen a los servicios de los ecosistemas, participando en la explotación y degradación de los recursos orgánicos y minerales del suelo.

Referencias

- Aira, M., Sampedro L., Monroy F., Domínguez J.** 2008. Detritivorous earthworms directly modify the structure, thus altering the functioning of a microdecomposer food web. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2511-2516.
- Azcon, R.** 2000. Papel de la simbiosis micorrizica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. (Eds) Alarcón, A y Ferrera-Cerrato. *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Colegio de Postgraduados. 1-15.
- Barois, I.** 1987. Interaction entre les Vers de terre (Oligochaeta) tropicaux géophages et la microflore pour l'exploitation de la matière organique du sol. Université d'Abidjan. Station d'Ecologie tropicale de LAMTO.
- Barois, I.** 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climate. *Soil. Biol. Biochem.* 24:1507-1510.
- Barois, I.** 1992. Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *Amyntas* (Megascolecidae) from cold and warm tropical climate. *Soil. Biol. Biochem.* 24:1507-1510.
- Barois, I., Lavelle P.** 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18: 539–541.
- Brown, G.G., Barois I., Lavelle P.** 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology.* 36:177-198.
- Brown, G.G., Barois I., Lavelle P.** 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology.* 36:177-198.
- Domínguez, J.** 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. En: Edwards, C.A. (ed.), *Earthworm Ecology*, 2nd edn., pp. 401-424, , CRC Press, Boca Raton FL USA.
- Domínguez, J., Aira M., Gómez-Brandón M.** 2009. El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. *Ecosistemas* 18 (2): 20-31.
- Domínguez, J., R.W. Parmelee, Edwards C.A.** 2003. Interactions between *Eisenia andrei* and nematode populations during vermicomposting. *Pedobiologia* 47:53-60.
- Edwards, A.C., Lofty J.R.** 1977. *Biology of earthworms*. Ed. Chapman and Hall. Boca Raton. London. Pp.1-261.
- Eriksen-Hamel, N.S., Whalen J.K.** 2007. Impacts of earthworms on soil nutrients and plant growth in soybean and maize agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 120: 442–448.
- Flack, F.M., Hartenstein R.** 1984. Growth of the earthworm *Eisenia foetida* on microorganisms and cellulose. *Soil Biol. Biochem.* 16: (5) 491-495.

- Flegel, M., Schrade S.** 2000. Importance of food quality on selected enzyme activities in earthworm casts (*Dendrobaena octaedra*, Lumbricidae). *Soil Biology & Biochemistry* 32:1191-1196.
- Fragoso C.** 2001. Las lombrices de tierra de México (ANNELIDA, OLIGOCHAETA): diversidad, ecología y manejo. *Acta Zoológica Mexicana*. 1:131-171.
- Fragoso,** 2001. Las lombrices de tierra de México (Annelida, Oligochaeta): Diversidad, Ecologica y manejo. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s) Numero especial. 1:131-171.
- Hallaire, V., Curmi P., Duboisset A., Lavelle P., Pashanasi B.** 2000. Soil structure changes induced by the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* and organic inputs in a Peruvian ultisol. *Eur. J. Soil Biol.* 36: 35-44.
- Horn, M.A., Schramm A., Drake H.L.** 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1662-1669.
- Huerta, E.L., Rodríguez-Olan J., Evia-Castillo I., Montejo-Meneses E., De la Cruz-Mondragon M., García-Hernández R.** 2008. Relación entre la fertilidad del suelo y su población de macroinvertebrados. *Terra Latinoamericano*. 26:171-181.
- Huerta, E., Rodríguez O.J., Castillo E.I., Montejo M.E., De la Cruz M. M., García H.R.** 2005. La diversidad de lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) en el Estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*. 21:75-85.
- Lattaud, C., Locati S., Mora P., Rouland C., Lavelle P.** 1998. The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Applied Soil Ecology* 9:189-195.
- Lavelle P., Lattaud C., Trigo D., Barois I.** 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* 170: 23-33.
- Lavelle, P.** 1983. The structure of earthworm communities. In: Satchell JE (ed) *Earthworm ecology: From Darwin to vermiculture*. Chapman and Hall, London, pp 449-465.
- Lavelle, P.** 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biol. Fertil Soils*. 6:237-251.
- Lavelle, P., Barois I., Cruz I., Fragoso C., Hernandez A., Pineda A., Rangel P.** 1987. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biol Fertil Soils*. 5:188-194.
- Lavelle, P., Barois I., Cruz I., Fragoso C., Hernandez A., Pineda A., Rangel P.** 1992. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biol Fertil Soils* 14:49-53.
- Lavelle, P., Bignell D., Lepage M.** 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers, *Eur. J. Soil Biol.* 33:159-193.
- Lavelle, P., Decaëns T., Aubert M., Barot S., Blouin M., Bureau F., Margerie P., Mora P., Rossi J.P.** 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*. 42:3-15.
- Lavelle, P., Lattaud C., Trigo D., Barois I.** 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and soil*. 170:23-33.
- Lavelle, P., Spain A.V.** 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Scientific Publications, Amsterdam.

- Lavelle, P.** 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function, *Adv. Ecol. Res.* 27:93–132.
- Lores, M., Gómez-Brandon M., Pérez-Díaz D., Domínguez J.** 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry.* 38:2993-2996.
- Merino-Trigo, A., Sampedro L., Rodríguez-Berrocal F.J., Mato S., Páez de la Cadena M.** 1999. Activity and partial characterisation of xylanolytic enzymes in the earthworm *Eisenia andrei* fed on organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry.* 31:1735-1740.
- Pop, V.V.** 1998. Earthworm biology and ecology-A case study. The genus *Octodrilus omodeo*, 1956 (Oligochaeta, Lumbricidae), from the Carpathians. Pp. 65-122. *In: Edwards A. C. (ed). Biology of earthworms.* Chapman and Hall. Boca Raton. London.
- Reynolds, W.J.** 1998. The status of earthworm biogeography, diversity and taxonomy in north America revisited with Glimpses into the future. Pp. 15-64. *In: Edwards A. C. (ed). Biology of earthworms.* Chapman and Hall. Boca Raton. London.
- Righi, G.** 1992. Four new peruvian earthworms. *Soil Biology and Biochemistry.* 24 (12):1223-1230.
- Rota, E., Omodeo P.** 1992. Phylogeny of Lumbricina: Re-examination of an authoritative hypothesis. *Soil Biology and Biochemistry.* 24 (12):1263-1277.
- Saavedra, M., Benitez E., Cifuentes C., Nogales R.** 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation.* 17: 93–102.
- Sampedro, L., Domínguez J.** 2008. Stable isotope natural abundances ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of the earthworm *Eisenia fetida* and other soil fauna living in two different vermicomposting environments. *Applied Soil Ecology* 38:91-99.
- Viljoen, S.A., Reinecke A.J., Hartman L.** 1992. The influence of temperatura on the life-cicle of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry.* 24 (12):1341-1344.
- Whalen, J.K., Parmelee R.W.** 1999. Quantification of nitrogen assimilation efficiencies and their use to estimate organic matter consumption by the earthworms *Aporrectodea tuberculata* (Eisen) and *Lumbricus terrestris* L. *Applied Soil Ecolog.* 13 (3):199-208.
- Zhang, B.G., Li G.T., Shen T.S., Wang J.K., Sun Z.** 2000. Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 2055-2062.

ANEXO A

Cepa	Taxón	% ID	Perfil Apiweb	Comentario identificación
La Mancha				
1SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.8	+++++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	99.9	+++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	99.9	+++-----+	EXCELENTE IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.1	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	98.1	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	98.1	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.9	---+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.9	---+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.6	-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
1SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.8	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	-----+	BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.9	-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.9	-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.9	-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97.7	-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++++	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.7	+++++++	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++++	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++++	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++++	MUY BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9	+++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	98.1	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	98.1	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.9	---+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	96.0	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9	+++-----+	BUENA IDENTIFICACION

Cepa	Taxón	% ID	Perfil Apiweb	Comentario identificación
2SMPtz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.3	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98.6	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.8	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.8	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	98.2	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.7	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	52.1	-----+-----+-----+	BAJA DISCRIMINACION
2SMPtz	<i>Shewanella putrefaciens group</i>	98.8	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.9	-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	98.8	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	98.4	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	99.9	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.2	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.6	-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.7	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97.7	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	96.2	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3SMPtz	<i>Vibrio metschnikovii</i>	99.9	+-----+-----+-----+	EXCELENTE IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
4SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.9	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION

Cepa	Taxón	% ID	Perfil Apiweb	Comentario identificación
4SMPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.4	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.4	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.4	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.6	---+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
4SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.6	---+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
4SMPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98.6	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	97.6	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	97.6	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.8	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.7	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Pseudomonas putida</i>	99.5	---+-----+	PERFIL DUDOSO
4SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.7	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97.7	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97.7	---+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4SMPtz	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99.1	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION

Cepa	Taxón	% ID	Perfil Api web	Comentario identificación
Plan de las Hayas				
1PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+--+--++++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+--+--++++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+--+--++++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
1PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.4	+--+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97.7	-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Photobacterium damsela</i>	99.9	--+++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	100.0	+-----+-----+	EXCELENTE IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	100.0	+-----+-----+	EXCELENTE IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.8	+++++-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.8	+++++-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
2PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+--+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.3	+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
2PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.5	+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.9	+++++-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	+--+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
3PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	95.0	+--+-----+	BUENA IDENTIFICACION

Cepa	Taxón	% ID	Perfil (Api web)	Comentario identificación
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.3	---+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.3	---+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.3	---+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas putida</i>	99.5	---+-----+-----+-----+	PERFIL DUDOSO
4PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.7	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98.6	---+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.3	+-----+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
4PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	96.0	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.3	---+-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8	-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
3PastizalPtz	<i>Pseudomonas putida</i>	99.5	---+-----+-----+-----+	PERFIL DUDOSO
4PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	99.9	--+++-----+-----+-----+	MUY BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.7	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98.6	---+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION
4PastizalPtz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.3	+-----+-----+-----+-----+	IDENTIFICACION ACEPTABLE
4PastizalPtz	<i>Photobacterium damselae</i>	96.0	+-----+-----+-----+-----+	BUENA IDENTIFICACION

ANEXO B

Bacillus sp. (Número de bases 860 b)

ATAATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGC
CTACAATCCGAAGTGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGACTTGCA
GCTCTTTGTCCCGTCCATTGCAGCACGTGTGTAGAAAAAGTCAAACGGGCATGT
CGATTCAACTTCATTCGCACCTTTGCTTACCCTACTCTTATATTATTAATAACTTAA
TTTTAATTTTCATATAATTAAGGTTGCACTTGTTCAGGACCTACCCACATGGTTAA
CAACAAGATCAAATCAACCATGCACCACCTGTCACCTCTGCTCCCGAAGGAGAAGC
CCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGAAAAGACCTGGGAAGGTTCTTCGCGTTGC
TTCTAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAGCCTTGCGGCCGTAACCTCTAACACATAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA
CCACGGAATCTAATCCTGTATGCTCCCCACGCTTTCTCGCCTCAATTCAGTTACAA
ACAAGAAAGTCAACTTCGCCACTGGTGTCCCTCATATATCTTCCCCATTTCCCCGC
TAAATGGAATTCCACTTTTCCCCTTCTGCACCCAAGTCTCCCCCTTTTCGATTGAC
CCTACCCGGTTGACCTGTGCTCTTTCAACAAAACTCCACGAGCGCGATTACGC
ATAATTATCCTGATAACTCTTGCCCCCAAACTCCCTGCTGTCAA

Bacillus megaterium (Número de bases 870 b)

TCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTT
GCAGCCTACAATCCCAATGTGAACGACTTTTTGCGAATTGGGGAAGTTGCGTGCGG
AGGAAAAAAGCGGAATTCCACGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCATTGGCGAACGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTA
AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCA
AGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCACTTCAGTTTCGGATTGAGGCTG
CAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCTCCCCCTCCAAAA

Bacillus megaterium (Número de bases 683 b)

ATTGATCCCCGATTACTACCATTCCCGCTTCTTGTACGAGTTGCAACCCACCCCTC
CAACTGAGAGGATTTATGGGATTGGCTTGACCTCCCGGTCTTGCGAGCCTTTGTA
TCCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAAGGTCATAAGGGCCATGATGATTTGACG
TCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACGGGCAGACACCTTAGAGTGACCCACTA
TATGCTGGACTAAGATAAAGGGGTGCGCTCGTTGAGGGAATAAACCAAAATTTCA

CGACACAAGCTGACAACAACAATGTACCACCTGTCTCTGTCCCCGGAGAGGAA
AGGCTCTATCTCTAAATTTGTCAGAGGATGTGACACGTGGGAGGATTCTGCGTTT
GCTTCAAAAAACACAATACTACCCCGACGGTGGCGGGCCCCCCCCCAATTCTTTGA
ATTTTACTCCTGCCACCCCTCTCCACCCGGAGAGGGGTTTGTGTCGTAGTCGCCA
CAATTCAGGGAAGAAACCCTCAAATCACTAACACTCCACCTTTTGCGCCTGGAATC
ACATGATATTAATCTTCTCGCTTCTCACTGTTTCCTCTCCGATGAATATAGAAAAA
AAGGACCTCCACCTGTGCTCTCCACTTCAC

Aeromonas punctata (Número de bases 673 b)

CGCATTCTATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCACACT
CCAATCCGACTACGACGCGCTTTCCGGGATTTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCAA
CCCTTTGTACGCGCCTTTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTTCCCCACCTTCTCCGGTTTATACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTACC
ACCATTAAGTGCTGGCAACAATGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCC
AACATCTCACGACCCTAGCTGACCACCGCAATGCATGACCGCGTTCTGATTGAG
AAAGCGCTCCAGCATCAATGTTGGATGCAAAACATGCCAAGGCAGGTAAGGTTCT
TCTCGTTGCATAATATTAACCAATGTCCACTGCTTGTCCGGCCCCCTTTAATTCAT
ATGAATTTAAACCTTGCCGCCCTTTCCAGGAAGTCGATTTAAGTTGTTTTCTCC
GAAGGCGCGTCTCATGGACACATCCTCTAAATCCACATTTTATACCGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTGTGCTCCCCACTTTTCTCACCTGATGAAATTACCAG
GGGGCCACCTCCCCATGGTTTCCTCCTCATCA

Bacterium Te35R (Número de bases 868 b)

GGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA
CTGCGATCCGAAGTGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGC
TGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATG
ATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAG
TGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGC
CCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAA
TGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTTCGCTC
CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGATCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACAT
CTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGT
TCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTT
AAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATCCGACAACGCTTGCCACCTA
CGTATTACCCGCCTGCTGGAAA

Terribacillus sp. WPCB002 (Número de bases 857 b)

TGGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCA
GCCTGCAATCCGAAGTGAAGATGGTTTTATGGGATTTGCTTAGCCTCGCGACTTTG

CTGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACTCTAGA
GTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGAATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACGCTG
TCCCCGAAGGGAACGTCTTGTCTCCAAGATTGTCAGCGGATGTCAAGACCTGGTA
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT
AATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACCTAGCACTCATC
GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTTCGCT
CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACA
TATCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAG
TTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACAGTTGAGCTGTGGGCTTTCACATCAGACTT
AAGAAACCGCCTACGAGCCCTTACGCCCAATAATTCCAGACAACGCTTGCCCCC
TACGTATTACCG

Bacillus sp. NQ-11/A2 (Número de bases 1249 b)

GGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAG
CCTACAATCCGAAGTGAAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTG
CAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACTTAGA
GTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTG
TCCCCGAAGGGGAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGG
TAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGAGTGC
TTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTTCG
CGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCA
CATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCA
AGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGA
CTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCC
ACCTACGTATTACGGGGCAATGATGAAGCCCTGGAGCTAGAGGGCTTGGATTTCA
ATGATGAAAACACGATCCCGAAGGTATTGGAAAATGGGAACTAGAGCAGAAGACT
ATTCCGTTAGTATGCTAGAGATGTGACACATTGGTACTGACTAGGTACCTCAGAAC
AAGTTCGTATATCTCCNAATCACGGTTTACAAACACGCCCCACATATTCTAG

Bacillus sp. (Número de bases 1293 b)

GGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAG
CCTGCAATCCGAAGTGAAGAATGGTTTTATGGGATTTCGCTTAACCTCGCGGTCTCG
CAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACTTAGA
GTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATCCTG
TCCCCGAAGGGGAACGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGGAGATGTCAAGACCTG

GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTA CTCCCAGGCGGAGTG
CTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTC
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
GCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC
ACATCTCTACGCATTTCAACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTTCTCTTCTGCACTC
AAGTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGGTGAGCCGGGGGCTNTCACATCAC
ACTTAAAGAACCCGTGCGCGCGCTTACGCCAATAACAGACAACGCTGCCCTACA
TATACGGGCGGGGAAAAAATCGACAAACCCGAAAAGTTTGAAACTTCCAATGG
AAGAAAAACACGGATCCCGGGGAGGGTCATTGGAAAAAGGGAACATAAATCCAAT
GTCTTTAGTGATGCAAAAGATGGGAAAACATGAAGGTCTCTTGCAACTAAAGGA
CCTTGGAATAAACCCCCCGCAGAAATGATTGCCCTAACGAAAAAGGCAGACA
ACCTACTTAC

Bacillus sp. TSH80 (Número de bases 865 b)

CTTGTGNNGGTGCGGTTGTACACGCGCCTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAAT
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG
TTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
AAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCT
AATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCACCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCCGCCCGTCA

Bacillus sp. JSK1 (Número de bases 856 b)

TCGGATTACTGGGCGTAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAA ACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAG
GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGC
CGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGA
CATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACTCTGACACAGGT
GCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACG
AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGAC

TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT
ACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCG
CGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGANTGANNNGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGAC

Bacterium K21A (Número de bases 869 b)

TGGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCA
GCCTACAATCCGAACCTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTT
GCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAG
AGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT
TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
GTCCCCCGAAGGGGAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTG
CTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTC
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTC
GCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC
ACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTC
AAGTTCCCGAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAG
ACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGATAACGCTTGCCA
CCTACGTATACCGGGGGGGGGGGGAAAA

Bacillus horikoshii (Número de bases 872 b)

TCGGATTTATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAAGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAG
AGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAAC
CGCGAGGTTTAGCCAATCCATAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAA
CTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCGGGCCTTGCCCCCCCCCAA

Pseudomonas aeruginosa (Número de bases 870 b)

ATCGGATTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGAGGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTCCAAAAGTACTGAGCTAGAGTATGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAG
CCGTTGGGGTCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTGCACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAAGTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCCAGACACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAAC
GAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT
ACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCG
CGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAAATGTACGGTGAATAC
GTTCCCGGGCTGTACACCCCCCGTCAA

Massilia timonae (Número de bases 846 b)

ATCGGATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAAGTCTGTCGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGATGGAGACTGCAAGGCTAGAATCTGGCAG
AGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGTCAAGATTGACGCTCATGCACGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCTACT
AGTTGTCGGGTTTTAATTAAGTGGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTAGACCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
GCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTG
ACATGTCAGGAAGGCCGAAGAGATTTGGCTGTGCCCGAAAGGGAACCTGAACAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
AACGAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATG
GGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTACATACAGAGGGCCGCAACCCGCGA
GGGGGAGCTAATCCAGAAAGTGTATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGA
CTACGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGTCT

Bacterium Te22R (Número de bases 1227 b)

GGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAG
ACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCG
CTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGA
GTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTCTG

CCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTA
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT
AATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATC
GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGC
TCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAC
ATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCTCTCCTCTTCTGCACTCAA
GTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGAC
TTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCA
CCTACGTATTACGGGCTGGAAAAGCGGTTGTCCGAATTATGGGGCGTAAAGGGG
CTCGCGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCACCGGGGAGGGTCAATTGGA
ACTGGGACTGATGCAAAGAGAGTGCATTCGTGTAGCGTGAATGCTAGTGTGGAG
ACATGCAAGGCTGGCTGACTGACGCTAGCGAGGAGACGAGTCCAAAAAATGGTC
CCCGATAGGAAGCGGGTCCC

Acinetobacter sp. BBI8 (Número de bases 859 b)

GTTCTTGTCCGGTGC GGTTGTACACACCGCCGTCAATCGATGTGATCTCCGCAGCT
TACTTGGAACCTGCTCGCCTGTCACCCTCGACTTGGCACACGGCGGTTCAATTCG
TGTCCGGAGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCCGCCCT
CTGGCCCAATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGG
CTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAA
GACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCCAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATACTAAGAACTTTCCA
AAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTA
TTTGCCAGCGGGTTATGGCGGGAACCTAAGGATACTGCCGGTGACAACTGGAG
AAGGGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAAAA
AGCCGATCGTAGTCCGGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTGCTGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACCCCC
CCCACA

Citrococcus sp. FIB146_2 (Número de bases 858 b)

TGAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGC
AGACCCCAATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTTGGGATTGGCTCCACCTCACAGTAT
CGCAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGC
ATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCA
TGAGTCCCCGGCATAACCCGCTGGCAACATGGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTG
AACCCGCCCAAAGGGGAAACCACATCTCTGTGGCGGTCGAGAACATGTCAAGC
CTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGG
GGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCGCGGAAACCGTGAATGGCCCCCACACCTA

GTGCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCA
TGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTG
TTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTAC
TGACTCCAGTCTGCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGGACTTTC
ACGGCAGACGTGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTCGCCCAATAAACGCTCGCGCC
CTAAGAATTACG

Bacillus sp. NQ-11/A2 (Número de bases 873 b)

GGATATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGA
AAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTCTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCG
CGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC
GCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGGTGAATACGTTT
CCGGGCCCTTGTACACCCGCCCGTCAAAAAA

Bacillus sp. GPTSA100-8 (Número de bases 853 b)

GGGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCA
GCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTT
GCGACTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACTTAG
AGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT
TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
GCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGACAGGATGTCAAGACCTGG
TAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTAATCCCAGGCGGAGTGC
TTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCG
CGCCTCAGTGTGAGTTGCAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA
TATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAA
GTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGAC
TTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGATAACGCTTGCCACCT
ACGTATTAC

Aeromonas sp. EO-0505 (Número de bases 853 b)

TATCGGATTACTGGGCGTAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATT
TGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT
TGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACA
GGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCAAGGGA
GACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAAAGGGCTGCAAGC
TAGCGATAGTGAGCGAATCCCAGAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGC
AACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGCCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTG

Bacillus mycoides (Número de bases 866 b)

GGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAG
CCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGC
AGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATG
ATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAG
TGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGC
TCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTA
ATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCGC
CTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATC
TCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCAATTTCTCTTCTGCACTCAAGTCT
CCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAA
GAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTA
CGTATACGGGGGGGGGGGAA

Bacillus subtilis subsp. Subtilis (Número de bases 872 b)

TCGGATTATTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTGTTGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC

CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACC
GCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCCCCCCCCAA

Pseudomonas sp. MI-o1 (Número de bases 853 b)

ATCGGATTACTGGGCGTAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGAGGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGA
GGGTAGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAG
CCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAAGTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCAAGACACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAC
GAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCT
TACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTG

Bacillus sp. DCR_C13 (Número de bases 868 b)

CCTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCT
ACAATCCGAAGTGAAGACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCA
CTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGT
GCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCT
CCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGAGTGCTTAA
TGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTT
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCC
TCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCT
CTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTTCTGCACTCAAGTCT
CCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAACTTAAGA

AACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAAATAATTCCGGATAACGCTTGCACCTACGT
ATTACCGCGGCCGCTGGCAA

Bacillus cereus (Número de bases 859 b)

TCTTGTCCGGTGCAGTTGTACACACCCGCCCGTCAGTCTGATGTGAAACCCCCGGC
TCAACCCGGGAGGGGCATTGGAACTGGGACACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
GGATTTCCATGTGTATCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCATTGGCG
ATTGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGACGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTTAA
GGGTTTCTTCCCTTTAGTGCTGAAATTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAATTAC
GGACGCCAGGCTGAAATTTATACTAATTTATCGGGATCCGCACAAGCGGTGGAGT
TTGTGGTTTTATTTCAAACACTACACGAAAAACCTTACCCGTGTTGACATCCCCTGAAA
TTCCTTTAAATTTTGCTTCTCCTTCGGTACCAGAGAGACAGGTGGTGTGGTTGTC
GTCCCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTACTCCAACCTCGAGCGCAACCCTTGATATT
ACTTGCCATCTTTATAATGGGCACTCCTCCCCAACTGTCCGTGACTAACCGTAGGA
AGGTGGGGATGACGCCAACTCCTCCTGCCCCCTTTCCACCTGATCTCCACCATTT
TACCACTACAGCTACAAATTCTACCCCCACCTACAAGGGGGGATATCTCATAAAACC
ATCACTTCCCAATTGATGCTGCCATTTTCCCTCCAATCTGGAATCCCCGTATTCC
TATCACCTGCCGTTCAATTCCCCCGGGGCCTTCCCCGCCCGTCA

Aeromonas sp. EO-0505 (Número de bases 867 b)

TATCGGATTACTGGGCGTAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGATT
TGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT
TGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGA
GACTGCCGGTGATAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAAAGGGCTGCAAGC
TAGCGATAGTGAGCGAATCCCAGAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGC
AACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTCCCCCCCCGTCA