



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

EDAFOLOGÍA

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL TRACTO DIGESTIVO
DE *Eisenia foetida***

JORGE ABRAHAM PÉREZ PÉREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de *Eisenia foetida***, realizado por el alumno: **Jorge Abraham Pérez Pérez**, bajo la dirección de Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESORA



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESORA



DRA. LUCÍA LÓPEZ REYES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero 2015

RESUMEN

DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL TRACTO DIGESTIVO DE *Eisenia foetida*

Jorge Abraham Pérez Pérez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2015

La participación de los microorganismos en el tracto digestivo de la lombriz de tierra es de gran importancia para la transformación de la materia orgánica. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar mediante métodos bioquímicos y moleculares las especies bacterianas residentes en el tracto digestivo de *Eisenia foetida*. Las lombrices fueron proporcionadas por el Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética (IRBIO) del Estado de Chiapas y el Colegio de Postgraduados (COLPOS) del Estado de México. Se emplearon 10 ejemplares de cada institución. El tracto digestivo de cada ejemplar fue dividido en tres secciones (A, B y C), de las que se aislaron bacterias en medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion o BHI). Se aislaron 56 cepas bacterianas de las lombrices de IRBIO y 44 del COLPOS. Se realizó el análisis macroscópico de las cepas bacterianas observándose colonias con elevación convexa; bordes enteros, ondulados y lobulados; color blanco y amarillo; forma circular e irregular y superficies lisas, rugosas y filamentosas. Cuarenta y cuatro de las cepas aisladas fueron Gram negativas y 56 Gram positivas. Para determinar el género y la especie de las bacterias aisladas del contenido intestinal, se realizó la identificación molecular considerando la secuencia de nucleótidos del gen 16S *rRNA*. Se identificaron nueve géneros en las lombrices provenientes de IRBIO: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*, y seis géneros de los especímenes del COLPOS: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*. Los géneros *Solibacillus* sp, y *Arthrobacter* sp no se encontraron en las lombrices del COLPOS y *Staphylococcus warneri* no estuvo presente en las lombrices del IRBIO. Se obtuvo mayor aislamiento bacteriano en la sección B, que es la región en la que se encuentra el buche y la molleja, donde el alimento es almacenado. El género *Bacillus* sp estuvo presente en las tres secciones (A, B y C). Se caracterizaron bioquímicamente las especies bacterianas encontradas en el tracto digestivo de *E. foetida*, con los sistemas API® 20NE y API 50CHB, reveló su habilidad para asimilar ciertos metabolitos así como su actividad enzimática. El presente trabajo contribuye al conocimiento de la diversidad bacteriana en el tracto digestivo de *E. foetida* con la idea de mejorar, en un futuro, la biotecnología del vermicompostaje.

Palabras claves: *Eisenia foetida*, diversidad bacteriana, secuenciación del gen 16S *rRNA*.

ABSTRACT

BACTERIAL DIVERSITY IN THE DIGESTIVE TRACT OF *Eisenia foetida*

Jorge Abraham Pérez Pérez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2015

Participation of microorganisms in the digestive tract of the earthworm is of great importance for the transformation of organic matter. The aim of this study was to isolate and identify through biochemical and molecular methods resident bacterial species in the digestive tract of *Eisenia fetida*. Earthworms were provided by the Institute Productive Restructuring and Bioenergetics (URBIO) the State Chiapas and the Graduate College (COLPOS) the State of Mexico. 10 earthworms of each institution were used. The digestive tract of earthworms was divided into three sections (A, B and C), of which bacteria were isolated in culture medium Brain Heart Infusion (BHI). Were isolated 56 bacterial strains of earthworms IRBIO and 44 the COLPOS. Was performed macroscopic analysis of the bacterial strains was colonies observed with convex elevation; entire margins, wavy and lobed; white and yellow; form circular, irregular and smooth, rough surfaces and filamentous. Forty-four of the isolates were Gram negative and 56 Gram positive. To determine the genus and species of bacteria isolated the intestinal contents, was performed molecular identification considering the nucleotide sequence of 16S rRNA. Nine genus were identified in earthworms from IRBIO: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*, and six genus of earthworm of COLPOS: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*. *Solibacillus* sp genus, and *Arthrobacter* sp were not found in the COLPOS earthworm and *Staphylococcus warneri* was not present in the earthworm of IRBIO. It was obtained greater bacterial isolation in the section B, which is the region in which the in maw and gizzard, where food is stored. The genus *Bacillus* sp was present in all three sections (A, B and C). Were characterized biochemically the bacterial species found in the digestive tract of *E. foetida*, with API® 20NE and API 50CHB systems, revealed his ability to assimilate certain metabolites and enzyme activity. This work contributes to the understanding of bacterial diversity in the gut of *E. fetida* with the idea of improving in the future biotechnology of vermicomposting.

Keywords: *Eisenia foetida*, bacterial diversity, 16S rRNA gen sequencing.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la obtención del grado de Maestría en Ciencias.

Al Dr. David Espinosa-Victoria, por su apoyo y conocimiento compartido durante mi formación profesional, así como disponibilidad y observación realizadas a la presente tesis.

A la Dra. Hilda Victoria Silva-Rojas, por su gran apoyo y conocimiento compartido durante mi formación profesional, y sus invaluable recomendaciones respecto al presente trabajo de investigación.

A la Dra. Lucía López-Reyes, por su disponibilidad y sus valiosas correcciones para el desarrollo de la presente investigación.

Al M.C. David Moreno, por brindarme su amistad, por su amabilidad y permanente disposición en el laboratorio.

A la Biol. Luz Gisela, por su invaluable ayuda, asesoría, su guía en el laboratorio, necesario para la elaboración de esta investigación.

A la Ing. Berenice Uribe, por su meritoria ayuda y asesoría en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Postgrado en Recursos Genético y Productividad.

A cada uno de los maestros, que participaron en mi desarrollo profesional en mi maestría, con ayuda y conocimientos asertivos.

A mis amigos y compañeros de este centro de investigación, que me apoyaron en distintas etapas de la maestría.

DEDICATORIA

A Dios por regalarme vida, salud y fortaleza primordialmente, mejorando día a día, superando restos, y dar lo mejor de mí.

A mis padres Jorge Pérez Pérez y Argelia López Pérez todo mi cariño y mi amor que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para bríndame toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes.

Cuanto mayor sea el esfuerzo, mayor es la gloria

Pierre Corneille

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I.INTRODUCCIÓN	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Importancia de la lombriz de tierra en los ecosistemas	5
2.2 Morfología de las lombrices de tierra	6
2.3 Taxonomía y hábitat de las lombrices de tierra	8
2.4 Biomasa de lombrices de tierra en los ecosistemas	9
2.5 Características morfológica de <i>Eisenia foetida</i>	10
2.6 La simbiosis lombriz de tierra-bacterias del suelo	11
2.7 Las lombrices de tierra y la descomposición de la materia orgánica	12
2.8 Enzimas que intervienen en el metabolismo de la interacción lombriz de tierra-bacteria	14
2.9 Poblaciones bacterianas en el suelo	15
2.10 Diversidad de microorganismo en el tracto de las lombrices de tierra	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV. OBJETIVO	22
V. HIPÓTESIS	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Procedencia de la lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i>	23
6.2 Fijación y disección de <i>Eisenia foetida</i>	23
6.3 Aislamiento de las bacterias del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i>	24
6.4 Análisis macroscópico y microscópico de las bacterias aisladas	24
6.5 Identificación molecular	25
6.5.1 Extracción del DNA bacteriano	25
6.5.2 Cuantificación del DNA	27
6.5.3 Amplificación del gen 16S rRNA	27
6.5.4 Secuenciación del gen 16S rRNA	28
6.5.5 Análisis filogenético	28

6.6 Análisis bioquímico de las cepas aisladas	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 Análisis macroscópico y microscópico de las bacterias aisladas	30
7.2 Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas	32
7.3 Secuenciación	32
7.4 Árboles filogenéticos	36
7.5 Análisis de la actividad enzimática de las bacterias	41
VIII. CONCLUSIONES	48
XI. LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Morfología externa de la lombriz de tierra.	6
2	Aparato digestivo de la lombriz de tierra.	7
3	Lombriz roja californiana (<i>Eisenia foetida</i>).	10
4	Efectos directos e indirectos de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica (MO). Se muestran las dos rutas de interacción que funcionan durante el proceso: la ruta mediada por las lombrices (líneas negras) y la ruta microbiana (líneas grises). Ambas rutas incluyen estados intermedios de descomposición (aquí llamados transformados –trans-) que dan como resultado la materia orgánica final (Moore <i>et al.</i> , 2004).	13
5	Ejemplares de <i>Eisenia foetida</i> A) provenientes IRBIO, Estado de Chiapas, y B) del COLPOS, Estado de México.	23
6	Secciones en las que se dividió el tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> .	24
7	Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> .	24
8	Cepas bacterianas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> . A) Cepa pura, B) Morfología macroscópica (colonial) y C) Morfología microscópica.	25
9	Extracción del DNA de las cepas bacterianas A) Colocación de la muestra en el tubo Eppendorf®, B) Incubación, C) Centrifugación y D) Obtención del DNA.	26
10	Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR empleando el Termociclador C100 Touch (BIO-RAD, USA).	27
11	Morfología colonial de las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> . A) Colonia de color amarillo, mucoide, con borde enteros y convexa, B) Colonia convexa, de color blanco, forma circular y borde entero, C) Colonia con forma de rizoide, filamentosa, con elevación umbilicada, D) Colonia plana, blanquecina,	31

de forma irregular, borde lobulado, con apariencia seca, que se asemejan huevo estrellado, **E)** Colonia convexa, blanquecina como cera, fusiforme y circular, con borde redondeado y **F)** Colonia de forma irregular, umbilicada y con borde ondulado.

- | | | |
|-----------|---|-----------|
| 12 | Morfología microscópica de bacterias aisladas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> , A) Gram negativas y B) Gram positivas. | 32 |
| 13 | Productos de amplificación del gen 16S rRNA de bacterias aisladas del contenido intestinal de <i>Eisenia foetida</i> , utilizando los iniciadores 8F/1492R. 1kb: Marcador del peso molecular de 1kb bases, A) J se refiere al Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética (IRBIO) y B) Cp al Colegio de Postgraduados (COLPOS). El número indica la cepa muestreada. | 32 |
| 14 | Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen16S rRNA, obtenido con el método de Máxima Parsimonia. Las bacterias se aislaron del intestino de <i>Eisenia foetida</i> proveniente del IRBIO, Estado de Chiapas. El análisis incluyó 57 secuencias nucleótidos. El índice de consistencia fue de 0.607890, el índice de retención de 0.901973 y el índice compuesto 0.598406 para todos los sitios informativos. | 39 |
| 15 | Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen 16S rRNA, obtenido con el método de Máxima Parsimonia. Las bacterias se aislaron del intestino de <i>Eisenia foetida</i> proveniente de COLPOS, Estado de México. El análisis incluyó 45 secuencias de nucleótidos. El índice de consistencia fue de 0.697309, el índice de retención de 0.927575 y el índice compuesto 0.709227 para todos los sitios informativos. | 40 |
| 16 | Determinación de la actividad enzimática bacteriana con el sistema API 20NE (BioMerieux®) A) Prueba negativa y B) Prueba positiva. | 41 |
| 17 | Asimilación bacteriana de las fuentes de carbono empleadas en el sistema API 50CHB (BioMerieux®) A) Prueba negativa y B) Prueba positiva. | 43 |

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	PÁGINA
1	Diversidad de microorganismos en el tracto digestivo de diferentes especies de lombrices.	17
2	Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de algunas especies de lombrices de tierra.	19
3	Técnicas empleadas para la identificación de bacterias en el tracto digestivo de diferente especie de lombriz de tierra.	20
4	Cepas bacterianas aisladas en las secciones A,B y C del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> .	30
5	Morfología colonial de las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> .	30
6	Especies bacterianas identificadas en el tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> empleando la secuenciación del gen 16S rRNA.	33
7	Frecuencia de las especies bacterianas en cada una de las secciones del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> .	36
8	Actividad enzimáticas de géneros de bacterias aisladas del contenido intestinal <i>Eisenia foetida</i> empleando el Kit API® 20NE.	41
9	Actividad enzimática de cada sección del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> con el Kit API® 20NE.	43
10	Actividad enzimáticas de <i>Bacillus</i> aisladas del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> empleando el Kit API® 50CHB.	45
11	Asimilación de fuentes de carbono por las bacterias de cada sección del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> con el Kit API® 50CHB.	47

I. INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra son indicadoras de la salud del suelo (Panigrahi, 2009). El suelo contiene una gran diversidad de microorganismos. Se ha reportado que 1 g de suelo contiene por lo menos un millón de microorganismo (Torsvik *et al.*, 2002), siendo las bacterias los microorganismos más diversos y abundantes sobre la Tierra (Venter *et al.*, 2004). Además, las bacterias son componentes inevitables de la dieta natural de las lombrices de tierra. Se conoce poco sobre las interacciones que se establecen entre las lombrices de tierra y los microorganismos del suelo (Hyun-Jung *et al.*, 2004).

La lombriz tiene un papel crucial en la modificación de la estructura del suelo, para la aceleración de la descomposición de la materia orgánica y del reciclado de nutrientes a través de sus interacciones con la microbiota (Domínguez *et al.*, 2009). Estos vermes, al ingerir la materia orgánica la transforman en humus, a través de su interacción con la microbiota, que se encuentra en su tracto digestivo, donde ciertas bacterias metabolizan el material orgánico por medio de enzimas específicas, como las proteasas, las amilasas, la xilanasas, y las celulasas. Sin embargo, la descripción de la materia orgánica en el sistema digestivo y el origen de las diferentes enzimas intestinales requieren más investigación, especialmente en las especies epígeas y anécicas (Brown *et al.*, 2000).

La mineralización de la materia orgánica está gobernada por la actividad de bacterias y hongos, los cuales están influenciadas por la fauna del suelo y por distintas interacciones de la red trófica que determinan la transferencia de nutrientes a través del sistema. Las deyecciones de las lombrices de tierra juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, porque contienen nutrientes y microorganismos diferentes de los contenidos en el material orgánico antes de la ingestión (Aira *et al.*, 2006a; Aira y Domínguez, 2009).

La descomposición de la materia orgánica en el compostaje incluye dos fases en relación con la actividad de las lombrices de tierra, (1) una fase activa o directa, durante la cual las lombrices procesan la materia orgánica, modificando sus propiedades físicas y su composición microbiana (Lores *et al.*, 2006) y (2) una fase de maduración o indirecta,

durante la cual los microbios asumen el control de la descomposición del material procesado por las lombrices (Domínguez, 2004). La duración de la fase activa no es fija, y depende de la especie y la densidad de lombrices, así como de sus tasas de ingestión y procesamiento de la materia orgánica (Aira y Domínguez, 2008).

La generación de conocimiento en este rubro es clave para entender los mecanismos biológicos que rigen en el vermicompostaje, que es un proceso aerobio de degradación y tratamiento de residuos orgánicos, basado en la acción conjunta y sinérgica de algunas lombrices de tierra y microorganismos (Domínguez, 2004). Se considera que el tracto intestinal de las lombrices actúa como un “bioreactor” donde, en condiciones ideales de temperatura, humedad y pH, se multiplican géneros de bacterias aeróbicas (Drake y Horn, 2007).

Actualmente, se reconoce que la lombricultura es un proceso biotecnológico de elevado interés ecológico y nutricional. Esta biotecnología utiliza primordialmente a la especie de lombriz domesticada *E. foetida*, como un componente del reciclaje de desechos orgánicos de diferente origen que constituyen el sustrato. Existen evidencias de que las lombrices de tierra aceleran la tasa de descomposición de la materia orgánica (Aira y Domínguez, 2008; Aira *et al.*, 2006a), por lo que el objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar, mediante métodos bioquímicos y moleculares, las bacterias residentes en el tracto digestivo de *E. foetida* presuntas responsables de la degradación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de la lombriz de tierra en los ecosistemas

Las lombrices de tierra participan ampliamente en la regulación de los procesos y la entrega de servicios al ecosistema (Lavelle *et al.*, 2006). Las lombrices proporcionan servicios a los ecosistemas tales como la formación del suelo, regularización y suministro del agua por su actividad mecánica dentro del suelo -dada la capacidad que poseen de moverse- creación de la estructura que afecta la aireación y la infiltración del agua y degradación de la materia orgánica y su mezcla con el suelo. Por estas razones, las lombrices de tierra son denominadas ingenieros del ecosistema (Brown *et al.*, 2000; Lavelle *et al.*, 2006).

Las lombrices de tierra proporcionan nutrientes al ecosistema al digerir la materia orgánica mediante su interacción con el microbioma mutualista que se encuentra en su tracto digestivo. No obstante, las lombrices de tierra afectan el ciclo de algunos nutrientes como el nitrógeno, ya que al alimentarse, asimilan la forma orgánica de este nutriente. Así, procesan grandes cantidades de materia orgánica, pero también asimilan nitrógeno. Por ejemplo, *Aporrectodea tuberculata* procesa de 5 a 13 mg de material orgánico g⁻¹ lombriz día⁻¹; mientras que *Lumbricus terrestris* va de 14 a 2.7 mg g⁻¹ día⁻¹. No obstante, la eficiencia del nitrógeno asimilado va de 10% a 26 % en *A. tuberculata* y de 25% a 30% en *L. terrestris*.

Whalen y Parmelee (1999) estiman que el consumo de las lombrices de tierra es de 11.8 a 17.1 mg de materia orgánica ha⁻¹, esto puede equivaler del 19 a 24% de los residuos de la materia orgánica de la cosechas. Las lombrices de tierra pueden aumentar la dispersión, actividad y crear un favorable ambiente para la multiplicación de los microorganismos (bacterias), favoreciendo efectos benéficos como el incremento de la actividad enzimática, liberación de nutrientes, etc. (Barot *et al.*, 2007). Por otro lado, está documentado que la aplicación de lombrices de *E. foetida* en suelos contaminados decrece la concentración de hidrocarburos en el suelo (Tejada y Masciandaro, 2011).

En general, la lombriz de tierra consume diariamente una cantidad de alimento equivalente a su peso, excretando 60% en forma de humus, el cual es rico en sustancias orgánicas. El 40 % restante es asimilado y utilizado por la lombriz para sus funciones vitales. Así, un kilogramo de lombriz, consume un kilogramo de desecho orgánico al día (Gupta y Garg, 2009). Además, la lombriz contiene una gran cantidad de proteína, que puede usarse como alimento de animales (Mendoza, 2008). Los oligoquetos se alimentan de materia orgánica en descomposición, hojas, animales muertos y vegetación (Viljoen *et al.*, 1992). Así, la primera función del aparato digestivo de la lombriz de tierra comienza con la actividad bucal y termina en la molleja. El material orgánico degradado pasa por la fracción intestinal, donde es colonizado por una alta carga microbiana simbiótica la cual forma a partir de los materiales complejos, amorfos coloidales que son expulsados como deyecciones y que reciben el nombre de humus de lombriz.

2.2 Morfología de las lombrices de tierra

La forma del cuerpo de la lombriz de tierra es casi cilíndrica y se encuentra dividida en segmentos. El cuerpo presenta tres regiones: 1) prostomio o región cefálica, a diferencia de los poliquetos, carecen de apéndices; 2) tronco o región media, constituida por metámeros (segmentos) , que oscilan entre 7 y 600 y 3) pigidio, donde se abre el ano (Figura 1). Ciertas especies poseen quetas sexuales más largas, las cuales 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 antibióticas de carácter defensivo (Horn *et al.*, 2003).

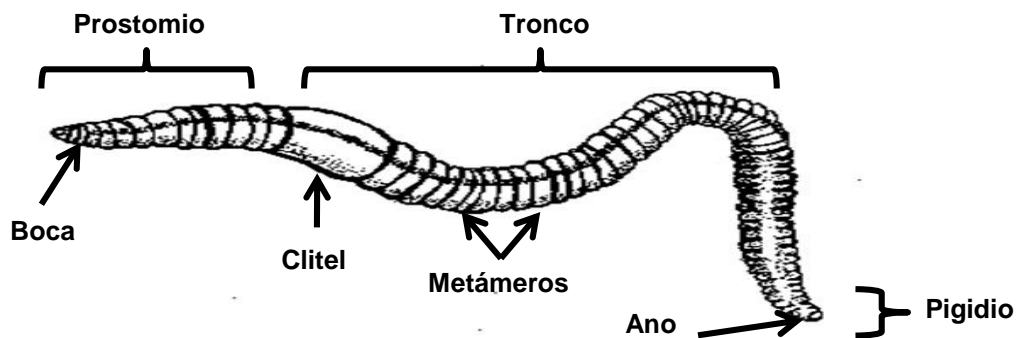


Figura 1. Morfología externa de la lombriz de tierra (Espinosa-Victoria, D. y H. Brito-Vega. 2010).

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 (células cloragógenas), y cumple una función análoga a la que realiza el hígado en otros grupos animales, sintetiza y almacena glucógeno, grasas y excretan urea (Horn *et al.*, 2003).

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 y en esta se encuentran suspendidos el intestino y otros órganos. Los oligoquetos tienen, típicamente un celoma espacioso, el cual se usa como hidroesqueleto, dividido en segmentos mediante tabiques transversales. El celoma comunica con el exterior por los poros dorsales y los poros excretores de los nefridios, situados en la región lateroventral (Edwards y Lofty, 1977).

El aparato digestivo es simple, constituido por una cámara bucal, faringe, esófago, buche, molleja e intestino (Figura 2). El aparato digestivo comienza con la parte superior de la apertura bucal; en esta parte se sitúa el prostomio, con forma de labio, y las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que pasa al esófago, donde se localizan las glándulas calcíferas. Para comer, la lombriz chupa el alimento a través de su boca. Cuando ésta llega al esófago, unas glándulas especiales se encargan de segregar carbonato cálcico, cuya finalidad es neutralizar los ácidos presentes en el alimento ingerido (Schaefer, 2003).

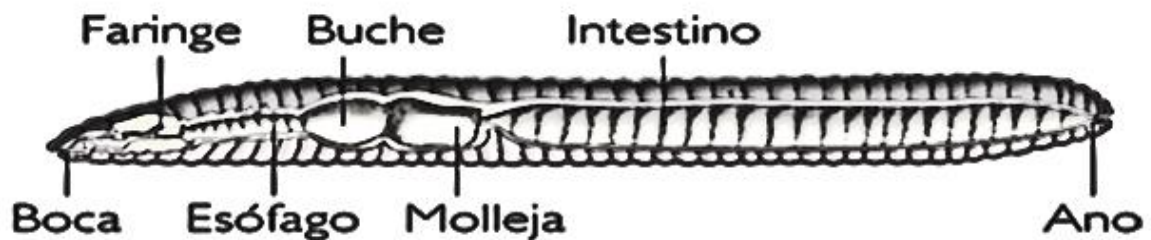


Figura 2. Aparato digestivo de la lombriz de tierra. <http://cienciaaldia.webnode.es/rss/all.xml>

2.3 Taxonomía y hábitat de las lombrices de tierra

La clasificación taxonómica de las lombrices de tierra es la siguiente: reino Animalia, orden: Oligoquetos y clase: Clitella (Edwards y Lofty, 1977). Se ha encontrado que, en mayor o menor extensión, estas desempeñan una función significativa mejorando la fertilidad del suelo. Actualmente, más de 7,245 especies de oligoquetos se han clasificado a nivel mundial, describiéndose 4,000 especies de lombrices de tierra (Fragoso, 2001). La última estimación de la riqueza de lombrices de tierra en México (Fragoso, 2007) indicaba 98 especies descritas, de las cuales 47 eran nativas y 51 exóticas. Desde entonces se han descrito 4 especies nativas más (Fragoso y Rojas, 2009a), por lo que actualmente, México cuenta con igual número de lombrices de tierra nativas y exóticas dando un total de 102 especies.

La clasificación trófica divide a las lombrices de tierra en tres categorías: fitófagas, fitogeófagas y geófagas, mientras que desde el punto de vista ecológico se dividen en: epígeas, anécicas y endógeas (Panigrahi, 2009).

Las especies epigeas, representadas por *Perionyx excavates* (oriental), *E. foetida* (Europa) y *Eudrilus euginiae* (África), viven sobre el suelo y se alimentan de vegetales y animales en descomposición (Curry y Schmidt, 2007). Son estas especies las que se usan en las prácticas de lombricomposta en el mundo.

Las especies anécicas son fitogeófagas y están representadas por *Lampito mauritii* (oriental) y *Lumbricus terrestris*. Viven en las primeras seis pulgadas del suelo y se alimentan de la materia orgánica que existe en la superficie, construyen túneles verticales permanentes, que atraviesan desde la superficie hasta la capa mineral, lo que puede ocurrir hasta la profundidad de cuatro a seis pies (108 a 162 cm). Se alimentan de la materia orgánica en descomposición, convirtiéndola en humus (Lavelle y Spain, 2001). El humus de lombriz es un abono orgánico benéfico para la flora y fauna microbiana del suelo, que es el resultado de la ingesta de la materia orgánica descompuesta (composta) por las lombrices siendo de color marrón a negruzco, granulado y sin olor (INIA, 2008).

Las especies endógeas son geófagas. Algunas especies, como *Metaphire posthuma*, *Pheretima elongate*, *Octochaetona serrata* y *O. thurstoni*, son lombrices grandes, que a menudo alcanzan 1 m o más de longitud. Viven en el suelo a mayor profunda y se alimentan solo del suelo mineral que suele tener material orgánico. Se trasladan a la superficie durante la estación lluviosa para depositar sus voluminosos excrementos (Panigrahi, 2009).

2.4 Biomasa de lombrices de tierra en los ecosistemas

En los ecosistemas naturales, como las selvas, se registra la mayor cobertura y diversidad vegetal, así como la mayor diversidad de lombrices. En cambio, la diversidad es menor en los agroecosistemas de monocultivo no arbóreos, monocultivo arbóreos, policultivos y pastizales inducidos (Huerta *et al.*, 2005). En promedio, la biomasa total de la macrofauna en un agroecosistema es de 5.1 g m^{-2} , mientras que en los bosques y las sabanas 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 y los acahuales alcanzan 38 g m^{-2} de la biomasa de la macrofauna, mientras que en los pastizales aumentan notablemente llegando a 73.2 g m^{-2} . En ambos casos el aumento de la biomasa es 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 de tierra representan del 10% al 40 % de la biomasa de los macroinvertebrados en los ecosistemas; mientras que en los agroecosistemas, representan del 60 al 80 %. Los oligoquetos están presentes mayormente en las selvas y en los sistemas manejados con árboles, estos macroorganismos pueden ser indicadores de la calidad del suelo (Huerta *et al.*, 2008).

2.5 Características morfológica de *Eisenia foetida*

La especie *E. foetida* es de color rojizo intenso, razón por la cual se le conoce con el nombre de “Roja Californiana”. El color no siempre lo determina el pigmento en la piel de la lombriz (Figura 3). La lombriz californiana ha sido criada intensivamente a partir de los años 50 en California, aunque es originaria de Euro-Asia (Rodríguez, 2010). La lombriz roja es de las más usadas en la lombricultura debido a su rusticidad, tolerancia a factores ambientales, alta tasa de crecimiento, alta eficiencia productiva y su fácil manejo (Gheisari *et al.*, 2010). Es la lombriz más conocida y empleada en más del 80% de las lombricompostas del mundo (Mendoza, 2008). Su clasificación taxonómica es: Reino: Animalia, Tipo: Anélido, Clase: Oligoqueto, Orden: Opisthopro, Familia: Lombricida, Género: *Eisenia*, Especie: *Eisenia foetida* (Acevedo, 1998).



Figura 3. Lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*)

El tamaño es 3 a 10 cm y de 3 a 5 mm de diámetro y pesa 1 g para el caso de las lombrices adultas. Su cuerpo es cilíndrico, las partes importantes son:

1. Prostomio: Es una pequeña protuberancia dorsal que comienza en el primer segmento el cual está separado por un surco.
2. Peristomio: Es el primer segmento, envuelve la boca y no tiene quetas o cerdas, su superficie es lisa y está recorrida por numerosos surcos longitudinales.
3. Quetas o cerdas: Son estructuras primariamente locomotoras formadas en invaginaciones de la piel.

4. Clitelo: Es un espesamiento glandular, superficial en algunos segmentos. Secretar la sustancia que forma los capullos, cocones o cápsula donde se alojan los huevos (Cristales, 2000). Los principales factores limitantes del crecimiento de la población se relacionan con la temperatura del sustrato, que debe estar entre 15 y 25 °C. La humedad del sustrato en la que sobrevive adecuadamente debe estar entre un 70 y 80 %, aunque tolera largos periodos de sequedad (Tineo 1994).

2.6 La simbiosis lombriz de tierra-bacterias del suelo

No se ha determinado, en la mayoría de las lombrices de tierra que posean enzimas para digerir la celulosa, la lignina, los taninos y los complejos húmicos. Estas enzimas están presentes o son producidas por los microorganismos del suelo, principalmente las bacterias. Los microorganismos son ingeridos por los invertebrados del suelo, donde degradan compuestos complejos orgánicos del suelo, volviendo asimilable la materia orgánica para las lombrices (Lattaud *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 2003). Entre la lombriz de tierra y la microbiota se establece una interacción mutualista para descomponer el material orgánico ingerido por la lombriz de tierra (Lavelle *et al.*, 1995).

Las lombrices requieren del ingreso de la microbiota a su tracto digestivo para llevar a cabo las actividades con las que contribuye a los servicios que ofrecen a los ecosistemas. Sin embargo, estudios comparativos de la masa microbiana tanto en campo como en laboratorio (Chaussod *et al.*, 1988), sugieren que los microorganismos se encuentran activos solo durante cortos periodos de tiempo y en sitios específicos del suelo. En otras palabras, las comunidades microbianas, compuestas de una riqueza enorme de especies, muchas de ellas formando grupos funcionales altamente especializados, probablemente se encuentren la mayor parte del tiempo bajo dormancia.

Así, las lombrices de tierra, dada su capacidad para mezclar suelo, enriquecer sustratos y transportar material, modifican el entorno de los microorganismos e interrumpen su dormancia. Entre la lombriz de tierra y microorganismos del suelo, se establece una relación mutualista de tipo anisimbiótico (Lavelle *et al.*, 1995; Daqui *et al.*, 2007). El término anisimbiótico hace referencia básicamente a la diferencia en

tamaño que existe entre los simbioses interactuantes. No obstante, también es una relación mutualista digestiva, debido a que los macroorganismos, como los macroinvertebrados, e incluso las raíces, se asocian con los microorganismos para explotar las fuentes orgánicas tanto de la hojarasca como del suelo (Janzen, 1985).

Es importante notar que, esta simbiosis también es transitoria dada a su temporalidad, suele llevarse a cabo funcionalmente fuera del macrosimbionte. Por estas diferentes características, Howe (1984) la ha calificado como una relación mutualista “difusa”. La materia orgánica (MO) del suelo está constituida de componentes de muy diversa índole y estado de descomposición, puede variar en función de la calidad de material, en la mineralización (azúcares, aminoácidos, hemicelulosa, celulosa, y lignina) y la humificación. El proceso de descomposición de la MO se ve favorecido por la participación de los organismos del suelo (micro y macroorganismos) que ingieren y transforma la mezcla de sustratos orgánicos e inorgánicos del suelo. Al término de este proceso, el producto final puede ser asimilado por las raíces u otros organismos.

Los organismos participan a diferentes niveles del sistema trófico, algunos se alimentan de microbios (microbívoros), de materia orgánica en descomposición (detritívoros), o la mezcla de microbívoros-detritívoros (Domínguez *et al.*, 2009). Se desconoce aún en qué 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 (Aira *et al.*, 2008; Sampedro y Domínguez, 2008).

2.7 Las lombrices de tierra y la descomposición de la materia orgánica

La descomposición es un proceso en cascada en el que la materia orgánica muerta experimenta una sucesión de transformaciones físicas y químicas en el suelo que conducen a la mineralización de una parte del recurso y al depósito de compuestos resistentes en forma de humus (Swift *et al.*, 1979). Las lombrices de tierra modifican la biomasa microbiana y su actividad de forma directa a través de la estimulación, digestión y dispersión de los microorganismos afectando en consecuencia a la estructura de las

comunidades de la microbiota y de la microfauna (Domínguez *et al.*, 2003; Lores *et al.*, 2006). Los efectos indirectos derivan de los directos e incluyen procesos de envejecimiento y mezclado de materiales modificados por las lombrices con otros sustratos orgánicos no modificados por ellas (Figura 4).

La degradación de la materia orgánica se da por la digestión que se efectúa en el tracto digestivo de la lombriz. Como resultado final se obtiene excretas o estructuras biogénicas (Brown *et al.*, 2000). Las lombrices trituran y digieren los desechos orgánicos con la ayuda de la microbiota anaeróbica o aeróbica, convirtiéndolos en material más fino, es decir, una composta homogénea que incluso puede haber reducido los niveles de algún contaminante (Gupta y Garg, 2009).

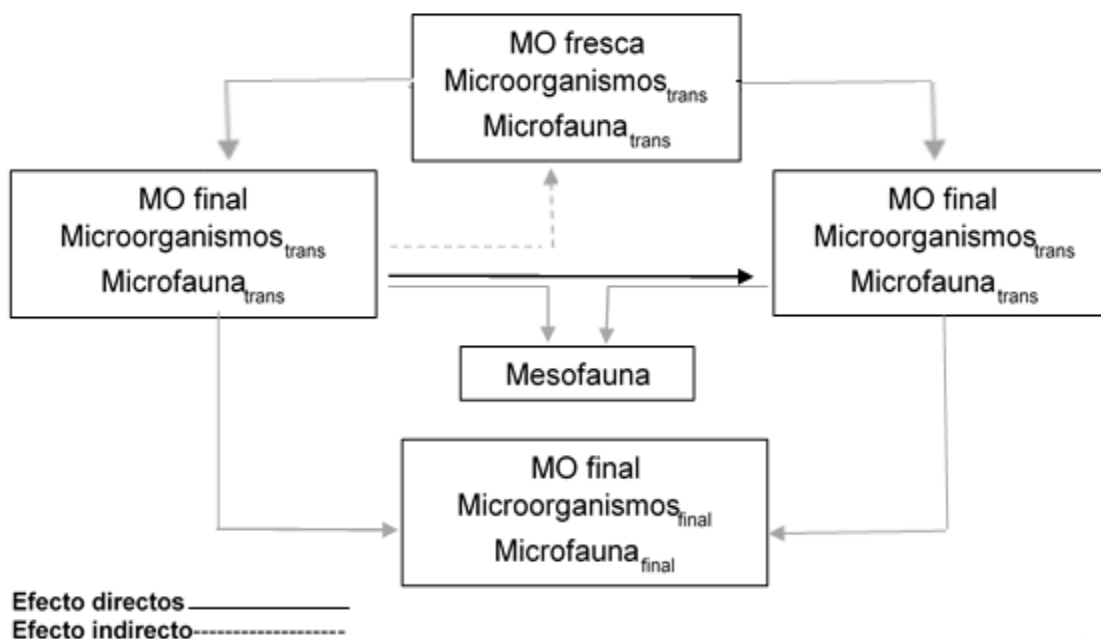


Figura 4. Efectos directos e indirectos de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica (MO). Se muestran las dos rutas de interacción que funcionan durante el proceso: la ruta mediada por las lombrices (líneas negras) y la ruta microbiana (líneas grises). Ambas rutas incluyen estados intermedios de descomposición (aquí llamados transformados –trans-) que dan como resultado la materia orgánica final (Moore *et al.*, 2004).

Las lombrices descomponen la materia orgánica, mediante un proceso en el cual ingieren y mezclan la materia inorgánica con la ya existente. Esta mezcla pasa a través

del tubo digestivo de las lombrices, las cuales aprovechan parte de ésta, y el resto se evacua en forma de excrementos, denominados turrículos, los cuales contribuyen a la formación de agregados en el suelo (Blanchart *et al.*, 1989). Además, estos organismos contribuyen a la aireación mejorando la estructura del suelo, mediante la formación de sistemas de galerías (Zhang *et al.*, 2003). Algunas, investigaciones indican que las lombrices estimulan considerablemente la descomposición de la materia orgánica durante el paso a través de su intestino, así como en el proceso de envejecimiento de las deyecciones (Aira *et al.*, 2007).

2.8 Enzimas que intervienen en el metabolismo de la interacción lombriz de tierra-bacteria

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, ésta enzima se ha venido considerando a lo largo de los años como exponente de la actividad microbiana del suelo y se ha relacionado con el estado de fertilidad edáfico (Guwy *et al.*, 1999). 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).

Las proteasas son las responsables de la descomposición progresiva de las proteínas a N peptídico y finalmente hasta N aminoacídico. Todas las reacciones químicas de la célula son catalizadas por enzimas. La gran mayoría de los invertebrados del suelo parecen no poseer enzimas para actuar directamente en la hidrólisis de la celulosa, la lignina, los taninos y algunos complejos húmicos. Las enzimas presentes en los microorganismos, contribuyen a la degradación de la materia orgánica en el tracto digestivo de las lombrices de tierra (Merino-Trigo *et al.*, 1999; Flegel y Schrade, 2000).

Las bacterias metabolizan el material orgánico en el aparato digestivo de la lombriz, por medio de enzimas específicas para cada sustrato: las proteasas catalizan la hidrólisis de proteínas, la amilasa hidroliza el almidón; la xilanasas degrada el material

vegetal (el xileno), las celulosas rompen los enlaces de la celulosa y la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea formando CO₂ y NH₃. Son enzimas que influyen en la liberación específica de nutrientes y en la calidad del alimento que es asimilado por el cuerpo de la lombriz (Merino-Trigo *et al.*, 1999; Flegel y Schrade, 2000).

2.9 Poblaciones bacterianas en el suelo

Las bacterias son los organismos más numerosos en el suelo (entre 10⁶ y 10⁷ UFC de bacterias g⁻¹). Las actividades en las que participan los microorganismos del suelo son la fijación de nitrógeno, degradación de celulosa, el ciclo del carbono, el ciclo del nitrógeno, incorporación de fósforo a la planta, interacción con otros microorganismos y control biológico (Repetto, 2005). A pesar de que los microorganismos son una fuente de alimento para las lombrices, la biomasa de bacterias, hongos y actinobacterias es mayor en las deyecciones frescas de las lombrices que en el suelo circundante ((Venter *et al.*, 2004).

Se considera que el aumento de las poblaciones microbianas se da en el tracto digestivo de las lombrices, debido a que el alimento que seleccionan constituye un sustrato más rico para el desarrollo microbiano. En la actualidad, la diversidad microbiana se puede estudiar mediante dos estrategias: 1) Aislamiento y caracterización de las cepas en medios de cultivo, lo que permite conocer la diversidad así como inferir algunas funciones de estos microorganismos (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, menos del 10% de los microorganismos de suelo crecen en los medios de cultivo, por lo que este método no puede evaluar la diversidad de toda la comunidad microbiana del suelo. 2) Métodos moleculares independientes de cultivo, en el que se aíslan el DNA metagenómico del suelo y se clonan algunos genes previamente amplificados por PCR (Zani *et al.*, 2000), que permiten conocer a los microorganismos cultivables y a los no cultivables presentes en el suelo.

Con el uso de métodos moleculares se han detectado cientos de especies por gramo de suelo agrícola, mientras que en suelos de bosque o pastizales, se han encontrado miles de especies debido a que albergan comunidades con mayor

complejidad (Widmer *et al.*, 1999). Los grupos más comunes que se encuentran en los suelos son las bacterias nitrificantes, las amonificantes, las que hidrolizan urea, las utilizan celulosa y bacterias que descomponen proteínas. Los géneros más representativos son: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Metallogenium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pedomicrobium*, *Pseudomonas*, *Sarcinas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Xanthomonas* (Alexander, 1980).

En los suelo agrícolas está ampliamente distribuido el género *Pseudomonas*, que desempeña funciones relacionadas con la descomposición de materia orgánica y la promoción del crecimiento de las plantas, aunque algunas pueden tener también efectos patogénicos (Saharan y Nehra, 2011). Adicionalmente, se ha encontrado que bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* y *Mycobacterium* tienen capacidad para producir Ácido Indo Acético (AIA) que promueve el crecimiento vegetal (Tsavkelova *et al.*, 2007).

Existen muchas especies bacterianas que tienen la actividad solubilizadora de fosfato (P) (Wakelin *et al.*, 2004). Estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos por diferentes especies microbianas del suelo (Khan *et al.*, 2010; Zaidi *et al.*, 2009). Entre las bacterias destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*; mientras que en el caso de los hongos se reportan principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y levaduras. La bacterias *Xanthomonas campestris* fue registrada recientemente como solubilizadora de fosfatos (Sharan *et al.*, 2008).

2.10 Diversidad de microorganismo en el tracto de las lombrices de tierra

La ingesta de material orgánico y suelo garantiza la presencia de diferentes microorganismos en el tracto digestivo de la lombriz de tierra (Cuadro 1). Una de las primeras publicaciones sobre microorganismos presentes en el intestino de estos

invertebrados fue la de Parle (1963), quien reportó poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos en *L. terrestres*, *Allolobophora caliginosa* y *A. longa*. Krištůfek *et al.* (1994) observaron un incremento en el número de bacterias, actinomicetos y hongos en el intestino de *L. rubellus*, en contraste con la microbiota detectada en *Aporrectodea caliginosa* y *A. caliginosa*.

Cuadro 1. Diversidad de microorganismo en el tracto digestivo de diferentes especies de lombrices.

Especies de lombrices	Número de especies			Hábitat	Referencias
	Actinomicetos	Hongos	Bacterias		
<i>Pontoscolex corethrurus</i>	-	-	13	Suelo ganadero	Bito-Vega <i>et al.</i> , (2010)
<i>Eisenia foetida</i>	-	-	91	Desecho industrial	Hyun-Jung <i>et al.</i> , (2004)
<i>Lumbricus rubellus</i>	-	-	95	Suelo agrícola	Furlong <i>et al.</i> , (2002)
<i>Lumbricus rubellus</i>	76	-	-	Suelo Forestal	Krištůfek <i>et al.</i> , (1993)
<i>Octalasion montanum</i>	175	-	-	"	"
<i>Eisenia lucens</i>	-	-	-	Suelo forestal	Szabó <i>et al.</i> (1976)
<i>Ortochaetona surensis</i>	-	22	-	Suelo tropical	Kritufek <i>et al.</i> , (1993)

Modificado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria (2009).

Las comunidades bacterianas en el interior de la lombriz de tierra han recibido especial atención. Méndez *et al.* (2003) han indicado que las bacterias pueden llevar a cabo algún tipo de mutualismo durante su paso a través del intestino de la lombriz de tierra. Este punto no ha sido estudiado en sentido estricto; no obstante, proponen la existencia de una simbiosis mutualista entre *Onychochaeta boricana* y *Bacillus cereus*. También, Márialigeti, (1979) y Szabó *et al.* (1976) reportaron que la diversidad bacteriana

en el segmento posterior del intestino de *E. lucens* estuvo compuesta de 473 organismos de los cuales el 73% correspondió al género *Vibrio*.

Hyun-Jung *et al.* (2004) aislaron bacterias aeróbicas del intestino de *E. foetida* proveniente de suelo contaminado de una zona industrial. La población microbiana correspondió a 91 colonias de bacterias clasificadas en 12 grupos, siendo el grupo dominante *Bacillus* 31%, seguido por *Rhodococcus* 19%, *Pseudomonas* 10%, *Streptomyces* 7%, *Microbacterium* 7%, *Aeromonas* 6%, *Gordonia* 6%, *Klebsiella* 6%, *Agromyces* 3%, *Nocardia* 2%, *Tsukamurella* 2% y *Bosea* 1%. Las especies del género *Bacillus* fue el grupo bacteriano más frecuentes. Además, Valle-Molinares *et al.* (2007) identificaron siete especies de bacterias típicas del suelo del género *Bacillus* (*B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* y *B. pabuli*) en el intestino de *Onychochaeta boricana*.

Brito-Vega *et al.* (2010) amplificaron y secuenciaron el gen 16S rRNA de aislamientos bacterianos del tracto digestivo de *Pontoscolex corethrurus*, colectada en dos zonas Plan de las Hayas (zona ganadera) y la Mancha (reserva ecológica con cultivo de plátano) en el estado de Veracruz. Se identificaron en total 8 géneros bacterianos en ambas zonas: *Bacillus*, *Terribacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Massilia*, *Aeromonas* y *Citrococcus*. El número de especies bacterianas de Plan de las Hayas y la Mancha fueron 11 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Massilia timonae*, *Bacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Citrococcus* sp., *Bacillus* sp., *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. mycoides*, *Pseudomonas* sp., y *B. cereus*) y 6 (*Bacillus* sp., *B. megaterium*, *B. horikoshii*, *Aeromonas punctata*, *Bacterium*, y *Terribacillus* sp.), respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diversidad bacteriana en el tracto digestivo de algunas especies de lombrices de tierra.

Lombriz de tierra	Hábitat	Actividad	Bacteria	Referencia
<i>Onychochaeta boricana</i>	Suelo pobre en materia orgánica	BPCV	<i>Bacillus</i> sp.	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Onychochaeta boricana</i>	Suelo forestal	BPCV	<i>Bacillus</i> sp.	Méndez <i>et al.</i> (2003)
<i>Eisenia foetida</i>	Suelo de zona industrial	BPCV	<i>Klebsiella</i> sp.	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Lumbricuss rubellus</i>	Agroecosistema	BPCV	<i>Azotobacter</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp <i>Pseudomonas</i> sp <i>.Klebsiella</i> sp.	Singleton <i>et al.</i> (2003)
<i>Onychochaeta boricana</i>	Suelo pobre en materia orgánica	Biocida	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Eisenia foetida</i>	Suelo de zona industrial	Bacterias de vida libre y simbióticas	<i>Flavobacterium</i> sp. <i>Nocardia</i> sp <i>Gordonia</i> sp <i>Vibrio comma</i> <i>Clostridium welchii</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Serratia arcscens</i> <i>Mycobacterium</i> sp.	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)

Tomado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria (2009). BPCV= Bacteria promotora del crecimiento vegetal

La identificación de las bacterias del tracto digestivo, requiere de condiciones de crecimiento similares a la del intestino de la lombriz y del uso de técnicas como PCR, (Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Técnicas empleadas para la identificación de bacterias en el tracto digestivo de diferente especie de lombriz de tierra.

Lombriz	Técnica	Bacterias Identificadas	Referencias
<i>Onychochaeta boricana</i>	Microscopía electrónica y PCR	<i>Bacillus</i> con siete diferentes especies y β -bacterias hemolíticas	Valle-Molinares <i>et al.</i> (2007)
<i>Eisenia foetida</i>	PCR-16S rRNA	22 especies	Hyun-Jung <i>et al.</i> (2004)
<i>Onychochaeta boricana</i>	Microscopía electrónica	<i>Bacillus</i> sp.	Méndez <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Técnica de hibridación <i>in situ</i> fluorescente y 16S rRNA	Identificadas: <i>Acidobacteria</i> ,	Singleton <i>et al.</i> (2003)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Técnica de hibridación <i>in situ</i>	<i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Actinobacteria</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	Fischer <i>et al.</i> (1995)

Tomado de Brito-Vega y Espinosa-Victoria (2009).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las lombrices constituyen un recurso potencial de gran interés en la sustentabilidad de la agricultura, pues participan activamente en la regulación de las propiedades físicas del suelo, la dinámica de la materia orgánica del entorno y el crecimiento de las plantas. Esto se debe a su capacidad de descomponer la materia orgánica, reciclar nutrientes y la formación de suelo, actividad que puede ser afectada por la presencia de elementos tóxicos en éste. Junto a otros organismos macrodescomponedores forman parte de la fauna del suelo. La lombriz roja (*Eisenia foetida*) forma parte de las herramientas biotecnológicas actuales para el reciclaje de desechos orgánicos, obteniéndose como beneficio el vermicompost (abono orgánico).

Las aportaciones de las lombrices al suelo se atribuyen a su interacción con los microorganismos del mismo, ya que estos son los directos responsables de la descomposición del material ingerido. 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 son sintetizadas por los microorganismos del suelo, principalmente las bacterias. Así, una vez que los microorganismos son ingeridos por los invertebrados dentro del tracto digestivo degradan los compuestos complejos gracias a las enzimas que sintetizan. Es probable que en el intestino del verme residan bacterias de importancia agrícola como las promotoras del crecimiento vegetal o las solubiizadoras de fosfato.

Sin embargo, se sabe poco sobre las interacciones que se establecen entre las lombrices y los microorganismos que residen en su intestino. El presente trabajo tiene por objeto conocer las especies bacterianas que residen en el tracto digestivo de la lombriz compostera *E. foetida*. El conocimiento generado podrá hacer más eficiente el proceso de vermicomposteo dada la posibilidad de modificar la flora bacteriana del verme, favoreciendo la presencia de especies bacterianas más eficientes en la transformación de la materia orgánica o en la detoxificación compuestos xenobioticos.

IV. OBJETIVO

Aislar e identificar mediante métodos bioquímicos y moleculares las especies bacterianas residentes en el tracto digestivo de la lombriz roja Californiana *Eisenia foetida*.

V. HIPÓTESIS

Las bacterias que residen en el tracto digestivo de *Eisenia foetida* pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Procedencia de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*

Los ejemplares de la especie *E. foetida* empleados en este estudio provinieron del Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética (IRBIO), Estado de Chiapas y del Colegio de Postgraduados (COLPOS), Estado de México. Las lombrices fueron alimentadas con pastos y estiércol de bovino en el primer caso y con residuos orgánicos (cáscaras de frutas, residuo de hortalizas y cascarón de huevo) en el segundo (Figura 5).



Figura 5. Ejemplares de *Eisenia foetida* A) provenientes IRBIO, Estado de Chiapas, y B) del COLPOS, Estado de México.

6.2 Fijación y disección de *Eisenia foetida*

Se emplearon 10 ejemplares de cada sitio de muestreo (IRBIO y COLPOS). Los especímenes se lavaron con agua destilada hasta quedar libres de suelo en su exterior. Se sumergieron en etanol al 70% tres veces por 30 s. Posteriormente, se enjuagaron en agua destilada-estéril y se fijaron con agua destilada a una temperatura de 50 °C por 10 s (Hyun-Jung *et al.*, 2004). La lombriz de tierra fue diseccionada longitudinalmente con un bisturí estéril hasta llegar al intestino. El tracto digestivo del oligoqueto fue dividido en tres secciones: A, que abarcó los segmentos 1 al 45, B de los segmentos 46 al 90, y C de los segmentos 91 al 135 (Figura 6).

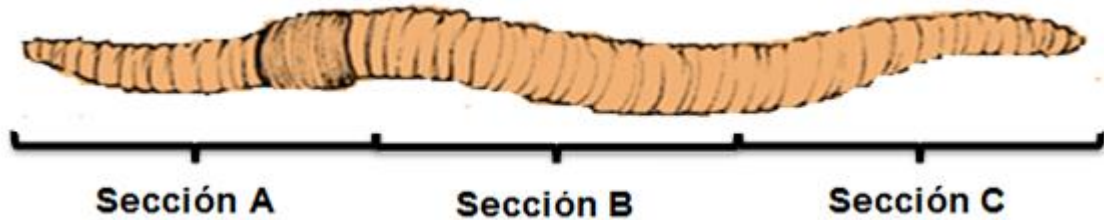


Figura 6. Secciones en las que se dividió el tracto digestivo de *Eisenia foetida*.

6.3 Aislamiento de las bacterias del tracto digestivo de *Eisenia foetida*

Se colocó una azada del contenido intestinal de cada sección (A, B y C), en placas del medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (DIFCO®), empleado para enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias, anaerobias y de difícil desarrollo. Las muestras se incubaron a 30 °C por 24 h. Una vez observado el crecimiento bacteriano, se procedió al aislamiento y purificación de las colonias (Figura 7) por estría cruzada en medio BHI (Horn *et al.*, 2003; Hyun-Jung *et al.*, 2004; Valle-Molinas *et al.*, 2007), verificando la pureza de los aislamientos.

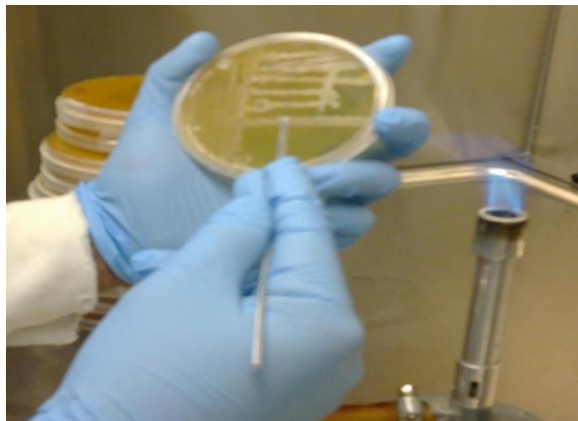


Figura 7. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del tracto digestivo de *Eisenia foetida*.

6.4 Análisis macroscópico y microscópico de las bacterias aisladas

Para el análisis macroscópico se determinaron características morfológicas coloniales como: color, tipo de borde, forma, elevación y superficie, de acuerdo a lo propuesto por Gómez *et al.* (2006) con la ayuda de un microscopio estereoscópico

MOTIC5M2-143. Para el análisis microscópico se empleó la tinción de Gram. Las cepas fueron observadas a 100X con un microscopio óptico MOTICBA-200 (Figura 8).

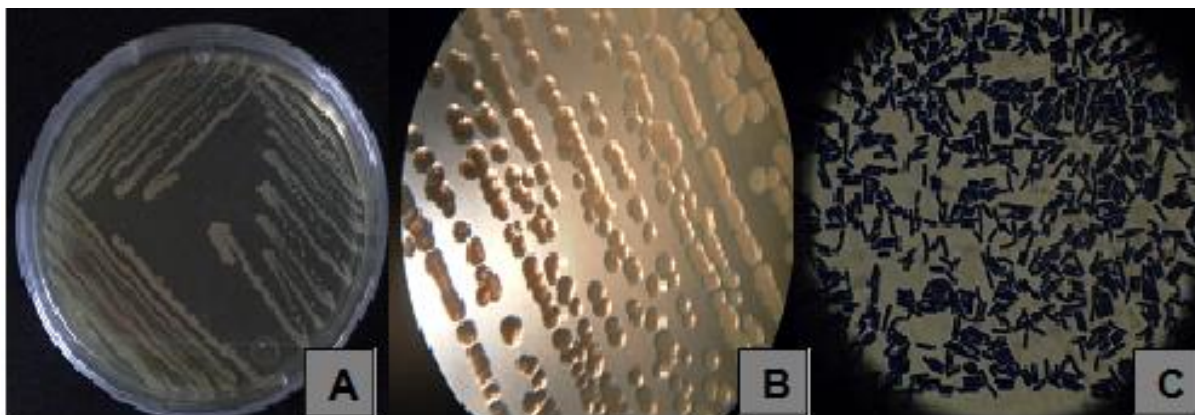


Figura 8. Cepas bacterianas del tracto digestivo de *Eisenia foetida*. **A)** Cepa pura, **B)** Morfología macroscópica (colonial) y **C)** Morfología microscópicas.

6.5 Identificación molecular

6.5.1 Extracción del DNA bacteriano

Se cultivó cada una de las cepas bacterianas en placas con medio BHI. Se realizó la extracción del DNA total de los aislados empleando un buffer con Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 2H₂O mM; CTAB 2%; NaCl 1.4 M) (modificado de Doyle y Doyle, 1990). Se colocó en un tubo 1 mL el buffer previamente calentado a 65 °C, se agregó una azada de bacterias y se incubó a una temperatura de 80 °C durante 1 h, mezclándose con el vortex cada 10 min. Luego se centrifugó a 11,150 rpm durante 5 min.

Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf® de 2 mL, al que se le agregaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), y se mezcló por inversión durante 10 min, a temperatura ambiente. Se realizó la segunda centrifugación a 11, 150 rpm por 10 min, para separar la fase acuosa y la fase orgánica. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf® de 2 mL. Posteriormente, se agregaron 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se agitó por inversión durante 10 min. En seguida se centrifugó durante 10 min a 11, 150

rpm. Se recuperó nuevamente el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf® nuevo con 600 μ L de etanol al 100% previamente enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para precipitar el DNA. Los tubos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h.

Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 11, 150 rpm, después se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla con 400 μ L de agua libre de nucleasas, se incubó en baño maría a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min para diluir por completo la pastilla de DNA. Para eliminar residuos de compuestos que pudieran afectar el proceso de secuenciación, se realizó un lavado adicional con acetato de sodio, y se re-suspendió con 1 mL de etanol al 95% y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Finalmente, se centrifugó a 11,150 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de isopropanol al 70 % y se centrifugó a 11,150 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó hasta que quedo completamente deshidratada (Figura 9). Finalmente, se hidrató con 80 μ L de agua libre de nucleasas dependiendo el tamaño de la pastilla.

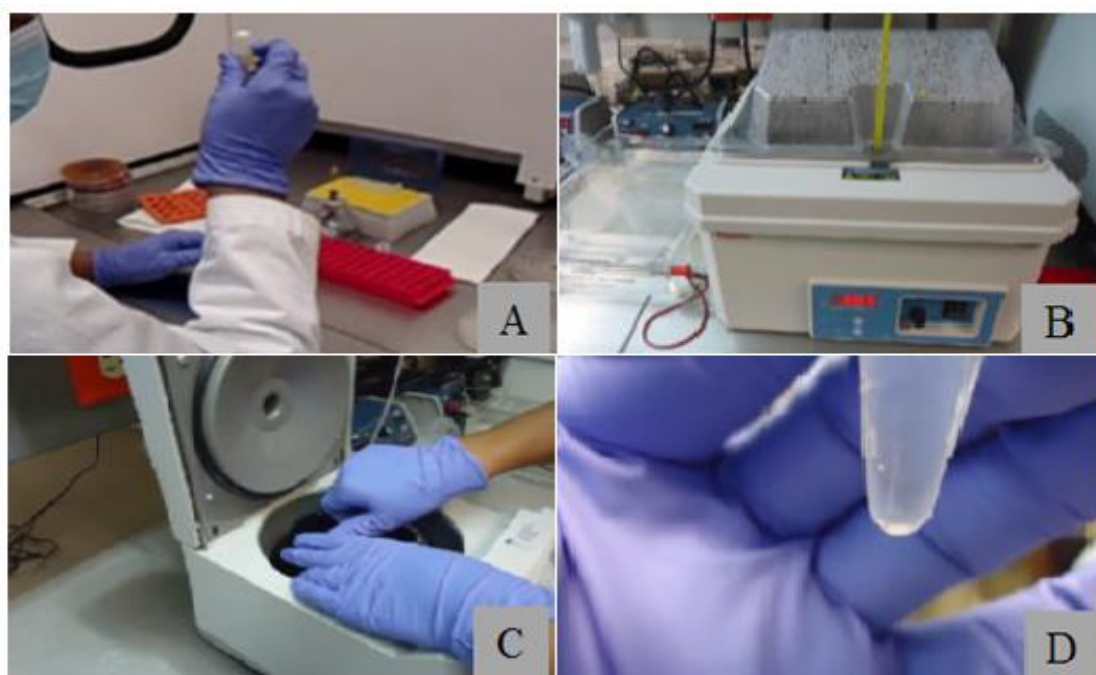


Figura 9. Extracción del DNA de las cepas bacterianas **A)** Colocación de la muestra en el tubo Eppendorf®, **B)** Incubación, **C)** Centrifugación y **D)** Obtención del DNA.

6.5.2 Cuantificación del DNA

La calidad y la concentración del DNA se verificaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} fueron iguales o ligeramente superior a 2. Obtenidas las concentraciones y la calidad del DNA, se realizaron cálculos para obtener una dilución a 20 ng. La integridad del DNA se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (Biotium, USA).

6.5.3 Amplificación del gen 16S rRNA

Para amplificar el gen 16S rRNA se usaron los iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'). Primeramente, para la reacción de PCR se adicionaron 5 μ L de Buffer, 13.1 μ L de agua grado HPLC, 1 μ L de dNTP's, 0.3 μ L de 8F, 0.3 μ L de 1492R, 0.3 μ L de enzima *Taq* DNA polimerasa y 5 μ L de la muestra de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C100 Touch, (BIO-RAD, USA) (Figura 10), empleando las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min. La temperatura de alineamiento fue de 50 °C por 30 s, con una extensión de 72 °C por dos min. Finalmente, se realizó una extensión final de un ciclo de 72 °C por 10 min (Silva, 2009; Vickerman *et al.*, 2007). El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (Biotium, USA). El producto final de PCR fue purificado con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.



Figura 10. Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR empleando el Termociclador C100 Touch, (BIO-RAD, USA).

6.5.4 Secuenciación del gen 16S rRNA

La reacción de secuenciación se realizó con el BigDye Terminator kit versión 3.0 (Applied Biosystems, USA), a un volumen total de 20 µL conteniendo 4.0 µL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 µL (5X) de BigDye Secuencing Buffer, 4 pM de cada iniciador y 2.0 µL de DNA templado, en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystems, USA). El programa tuvo dos desnaturalizaciones del DNA, la primera fue a 95 °C por 1 min, y la segunda a 95 °C por 10 s (35 ciclos). La temperatura de hibridación fue de 50 °C por 5 s y la temperatura de polimerización de 60 °C por 4 min. Las secuencias de cada aislamiento obtenido para la región 16S rRNA, se compararon con secuencias depositadas en el GenBank del NCBI con la opción BLAST_nucleotide 2.2.29 (Benson *et al.*, 2009).

6.5.5 Análisis filogenético

El análisis evolutivo se realizó con el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). La historia evolutiva de las secuencias de los diferentes sitios se infirió usando el método de Máxima Parsimonia. La confiabilidad de los árboles formados asociados en grupos de taxa se realizó con la prueba de bootstrap con 1000 repeticiones, los árboles de Máxima Parsimonia se obtuvieron usando el algoritmo Tree-Bisection-Regrafting (Lewis, 2001).

6.6 Análisis bioquímico de las cepas aisladas

Se realizaron pruebas de caracterización bioquímica a las cepas bacterianas de los diferentes géneros aislados del intestino de *E. foetida*. Se usaron los kits comerciales de BioMerieux® API 20NE para bacterias Gran negativas exigentes y el API 50CHB, se usó para las especies de *Bacillus*. Cada galería de API se inoculó con base en las recomendaciones del fabricante y se incubaron a 30 °C haciendo lecturas a las 24 y 48 h. Durante el periodo de incubación, la fermentación se detectó por un cambio de coloración en la cúpula, debida a la producción de ácido en anaerobiosis. El perfil bioquímico obtenido se comparó con la base en datos API®/ID32 mediante el programa apiweb™ (Logan y Berkeley, 1984).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo de alimento y el hábitat son factores que promueven cambios en la comunidad bacteriana del tracto digestivo de la lombriz de tierra (Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009). En el presente estudio se obtuvieron 100 cepas, cuyo crecimiento se manifestó a las 24 h. Se aislaron 56 y 44 cepas bacterianas de *E. foetida* provenientes del IRBIO y del COLPOS, respectivamente. Numéricamente, se encontró mayor cantidad de bacterias en las lombrices alimentadas con estiércol de bovino y pasto. Es probable que el estiércol bovino sea una fuente significativa de especies bacterianas para *E. foetida*.

En el Cuadro 4, se presenta el número de cepas bacterianas aisladas en las diferentes secciones del intestino de *E. foetida*. El mayor número de cepas bacterianas se obtuvo en la sección B. La sección A es la región que contiene la boca, donde la lombriz inicia su alimentación, en la que probablemente no hay selección de microorganismos. En contraste, en la sección B se encuentran localizados el buche y la molleja, lugar donde el alimento es almacenado, y donde probablemente exista “selección” bacteriana por parte del oligoqueto. Por esta razón, en esta zona se espera un incremento en el número de colonias bacterianas así como una mayor actividad enzimática por parte de éstas (Singleton *et al.*, 2003).

En la sección C, que corresponde a la parte final del intestino y el ano, disminuyó el número de colonias bacterianas, pero éste se mantuvo ligeramente por arriba de la sección A. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que sustenten la supuesta “selección” bacteriana por parte de la lombriz de tierra, que explique el mayor número de colonias bacterianas en la sección B.

Cuadro 4. Cepas bacterianas aisladas en las secciones A, B y C del tracto digestivo de *Eisenia foetida*

Sección del tracto digestivo	IRBIO ¹	COLPOS ²
A	17	13
B	21	17
C	18	14

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

7.1 Análisis macroscópico de las bacterias aisladas

Las cepas bacterianas aisladas de lombrices provenientes de ambas localidades presentaron similar morfología colonial; no obstante, la forma de rizoide solo se presentó en ejemplares provenientes de IRBIO (Cuadro 5).

Cuadro 5. Morfología colonial de las bacterianas aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida*.

Procedencia	Borde	Forma	Elevación	Superficie	Color
IRBIO¹	entero (22)	circular (20)	plana (22)	lisa (25)	blanca (29)
	ondulado (24)	irregular (32)	convexa (18)	rugosa (19)	amarilla (27)
	lobulado (10)	rizoide (4)	elevada (16)	filamentosa (12)	
COLPOS²	entero (13)	circular (18)	plana (13)	lisa (21)	blanca (15)
	ondulado (20)	irregular (26)	convexa (16)	rugosa (14)	amarilla (19)
	lobulado (11)		elevada (15)	filamentosa (9)	

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

La cifra entre paréntesis corresponde al número de colonias

Se observó crecimiento de colonias de color amarillo y blanco, con elevación convexa o plana y con bordes ondulado o entero. En la Figura 11 se muestran fotos de la morfología colonial de las bacterias aisladas del tracto digestivo de lombrices de tierra provenientes de IRBIO y COLPOS.

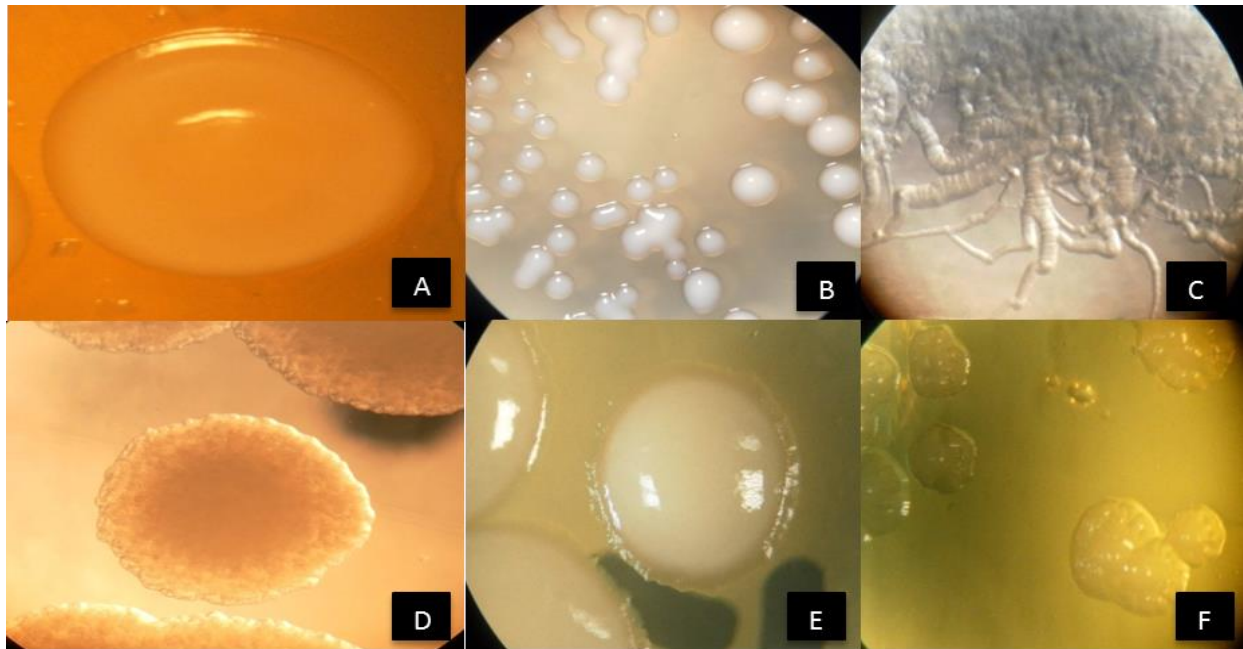


Figura 11. Morfología colonial de las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida*. **A)** Colonia de color amarillo, mucóide, con borde enteros y convexa, **B)** Colonia convexa, de color blanco, forma circular y borde entero, **C)** Colonia con forma de rizoides, filamentosa, con elevación umbilicada, **D)** Colonia plana, blanquecina, de forma irregular, borde lobulado, con apariencia seca, que se asemejan huevo estrellado, **E)** Colonia convexa, blanquecina como cera, fusiforme y circular, con borde redondeado y **F)** Colonia de forma irregular, umbilicada y con borde ondulado.

El análisis microscópico reveló que, la población bacteriana estuvo compuesta por 44 cepas Gram negativas y 56 Gram positivas (Figura 12). Un número considerable de bacterias encontradas son de importancia agrícola, simbiótico mutualistas o simbiótico parasíticas. En este caso particular, se puede decir que *E. foetida* albergó preferentemente bacterias Gram positivas en su tracto digestivo.

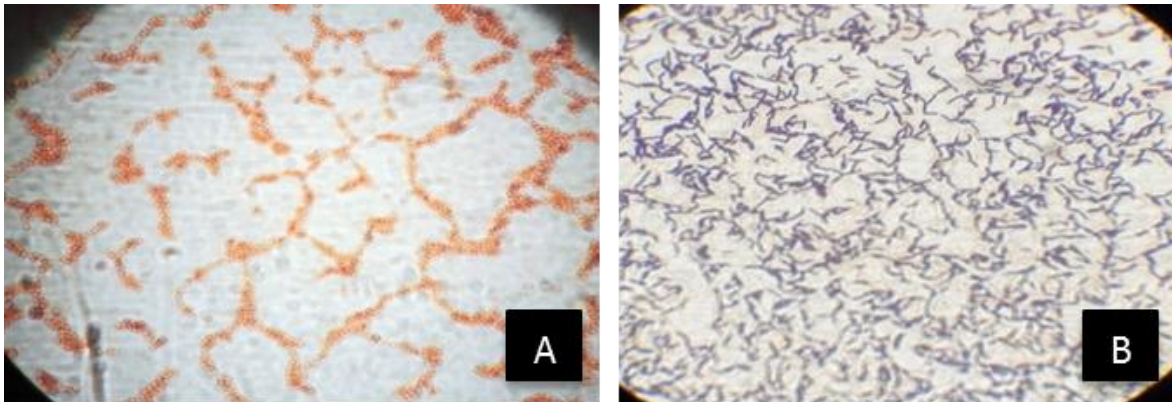


Figura 12. Morfología microscópica de bacterias aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida*, **A)** Gram negativas y **B)** Gram positivas.

7.2 Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas

Se amplificaron los fragmentos de las 100 cepas seleccionadas. La amplificación del gen 16S rRNA mostró una banda aproximada de 1 500 pares de bases (pb) usando los iniciadores 8F y 1492R. La Figura 13 muestra las bandas obtenidas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de algunas de las cepas bacterianas analizadas.

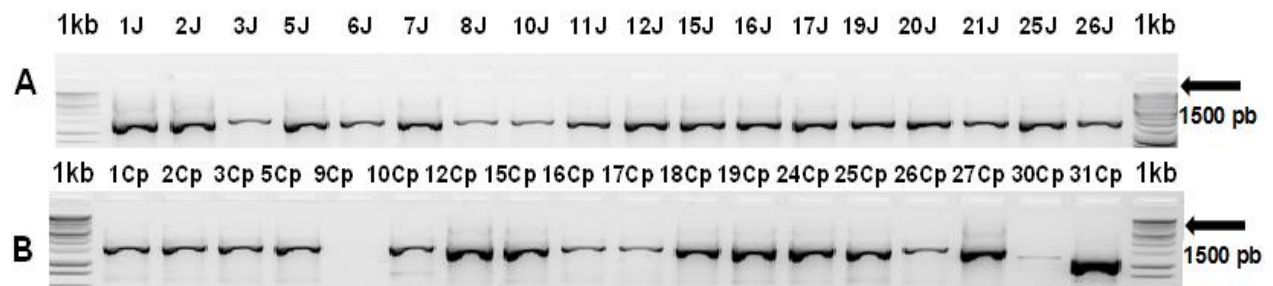


Figura 13. Productos de amplificación del gen 16S rRNA de bacterias aisladas del contenido intestinal de *Eisenia foetida*, utilizando los iniciadores 8F/1492R. 1kb: Marcador del peso molecular de 1kb bases, **A)** J se refiere al Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética (IRBIO) y **B)** Cp al Colegio de Postgraduados (COLPOS). El número indica la cepa muestreada.

7.3 Secuenciación

Las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos del GenBank (NCBI). En el Cuadro 6 se presentan la especies bacterianas aisladas del contenido intestinal de *E. foetida*. En los especímenes provenientes de IRBIO se

identificaron nueve géneros bacterianos: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*; mientras que en las lombrices de tierra provenientes de COLPOS se identificaron seis: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*. El género que predominó fue *Bacillus* con 10 especies (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. simplex*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. flexus*, *B. aryabhatai*, *B. safensis* y *B. stratosphericus*) que estuvieron presentes en alguna de las secciones (A, B y C) del intestino de *E. foetida* proveniente de ambas regiones.

Cuadro 6. Especies bacterianas identificadas en el tracto digestivo de *Eisenia foetida* empleando la secuenciación del gen 16S rRNA.

IRBIO ¹	Núm. Cepas	COLPOS ²	Núm. Cepas	TOTAL
<i>Bacillus</i> sp.	9	<i>Bacillus</i> sp.	7	16
<i>Bacillus subtilis</i>	4	<i>Bacillus subtilis</i>	5	9
<i>Bacillus cereus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i>	2	3
<i>Bacillus megaterium</i>	1	<i>Bacillus megaterium</i>	2	3
<i>Bacillus safensis</i>	2	<i>Bacillus safensis</i>	4	6
<i>Bacillus pumilus</i>	3	-	-	3
<i>Bacillus simplex</i>	5	-	-	5
-	-	<i>Bacillus aryabhatai</i>	2	2
-	-	<i>Bacillus stratosphericus</i>	2	2
<i>Bacillus flexus</i>	4	-	-	4
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	<i>Paenibacillus</i> sp.	1	3
<i>Solibacillus</i> sp.	5	-	-	5
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	-	-	5
-	-	<i>Staphylococcus warneri</i> ,	9	9
<i>Arthrobacter</i> sp.	4	-	-	4
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	-	-	1
<i>Acinetoacter iwoffii</i>	6	<i>Acinetoacter iwoffii</i>	1	7
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	6	7
<i>Aeromonas media</i>	3	<i>Aeromonas media</i>	3	6

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

Algunos investigadores demuestran que los microbios en el intestino de la lombriz están asociados con el perfil microbiano del suelo y con las fuentes de alimento (Knapp *et al.*, 2008; Jayasinghe y Parkison, 2009). Valle-Molinares *et al.* (2007) identificaron por amplificación del gen 16S rRNA y microscopía electrónica en el intestino de *Onychochaeta boricana* 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.

El tracto digestivo de las lombrices actúa como un “bioreactor” en el que bajo condiciones ideales de temperatura, humedad y pH, se multiplican las bacterias aeróbicas (Drake y Horn 2007). La bacteria *Bacillus* sp., predominó en la secciones A, B y C del tracto digestivo de *E. foetida* procedente de IRBIO y del COLPOS con un total de 16 aislamientos. Las especies *Bacillus simplex*, *Solibacillus* sp, *Arthrobacter* sp., predominarón en las tres secciones A, B y C del tracto digestivo de los ejemplares provenientes del IRBIO con un frecuencia de 5, 5 y 4, respectivamente. En cambio, *Staphylococcus warneri* predominó en las tres secciones del tracto digestivo de *E. foetida* proveniente del COLPOS, con una frecuencia de 9 (Cuadro 7).

Hyun-Jung *et al.* (2004) aislaron 91 colonias bacterianas del tracto digestivo de *E. foetida* proveniente de suelo contaminado de una zona industrial, e identificaron 12 grupos al secuenciar el gene 16S rDNA: *Aeromonas* 6%, *Agromyces* 3%, *Bacillus* 31%, *Bosea* 1%, *Gordonia* 6%, *Klebsiella* 6%, *Microbacterium* 7%, *Nocardia* 2%, *Pseudomonas* 10%, *Rhodococcus* 19%, *Tsukamurella* y *Streptomyces* 7%. Al igual que en el estudio de Hyun-Jung *et al.*, (2004), en el presente experimento el género *Bacillus* fue el grupo con mayor dominancia en el intestino de *E. foetida*; no obstante, la diversidad bacteriana fue menor en los especímenes provenientes de ambas regiones. Es probable que la baja diversidad en el presente estudio se deba a que el medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (DIFCO®), favorezca el crecimiento de bacterias específicas residentes del tracto digestivo de *E. foetida*.

Byzov *et al.* (2007), reportaron la presencia de las especies *A. oxydans*, *B. subtilis*, y los géneros *Kocuria*, *Microbacterium* y *Paenibacillus* sp. en el intestino de *E. foetida*. También, se han aislado los géneros *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, y *Staphylococcus* del tracto digestivo de *E. foetida* proveniente de suelos de zonas industriales (López-Hernández, 2007). Singleton *et al.* (2003) al estudiar las bacterias asociadas al intestino de *Lumbricus rubellus*, identificaron los géneros *Acidobacteria*, *Firmicutes* y β -*Proteobacteria*, e indicaron que una pequeña cantidad de organismos oportunistas dominó la comunidad microbiana del intestino.

Garbeva *et al.* (2003) realizaron estudios de la microbiota de suelos agrícolas mediante la técnica de PCR, y determinaron que aproximadamente 95% del DNA presente en ellos pertenecía a especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. Algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* producen varios metabolitos que poseen actividad antifúngica. Estos compuestos tienen importancia fundamental en el control biológico de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Gaeummanomyces*, *Pythium* y *Phytophthora*. Por su importancia, muchos se han estudiado y caracterizado, tal es el caso de los compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica, entre los que se encuentran las micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, micosubtilinas y fungistatinas (Souto *et al.*, 2004).

Los géneros *Aeromonas*, y *Bacillus* estuvieron presentes en las tres secciones del tracto digestivo de *E. foetida* provenientes de ambas regiones. En los ejemplares del IRBIO se identificaron los géneros *Pantoea*, *Arthrobacter* y *Solibacillus*, pero estos no estuvieron presentes en los ejemplares del COLPOS. El género *Pantoea agglomerans* es una enterobacteria aislada frecuentemente en plantas, frutas y vegetales, también se ha encontrado en heces fecales humanas y de animales (Andersson *et al.*, 1999).

El género *Arthrobacter* encontrado en el tracto digestivo de *E. foetida* puede encontrarse fundamentalmente en el suelo, donde representa una fracción importante de la comunidad bacteriana. Algunas especies del género *Arthrobacter* tienen la capacidad de crecer en ausencia de oxígeno provocando la reducción del nitrato a amonio

(Eschbach *et al.*, 2003). El género *Acinetobacter*, es empleado para la producción de un número considerable de productos extra e intracelulares como las lipasas, proteasas, cianoficina, bioemulsificantes y numerosos polímeros (Abdel-El-Haleem, 2002a).

Cuadro 7. Frecuencia de las especies bacterianas en cada una de las secciones del tracto digestivo de *Eisenia foetida*.

Bacteria	Sección A		Sección B		Sección C		Total
	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²	
<i>Bacillus</i> sp.	2	3	4	2	3	2	16
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	3	3	1	2	9
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	1	1	1	3
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	1	2	-	-	3
<i>Bacillus safensis</i>	-	2	2	-	-	2	6
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	3	-	3
<i>Bacillus simplex</i>	1	-	2	-	2	-	5
<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	1	-	-	-	1	2
<i>Bacillus stratosphericus</i>	-	2	-	-	-	-	2
<i>Bacillus flexus</i>	1	-	1	-	2	-	4
<i>Paenibacillus</i> sp.	1	-	1	1	-	-	3
<i>Solibacillus</i> sp.	2	-	2	-	1	-	5
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	-	3	-	-	-	5
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	3	-	4	-	2	9
<i>Arthrobacter</i> sp.	1	-	1	-	2	-	4
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	4	-	1	-	1	1	7
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	2	-	2	1	2	7
<i>Aeromonas media</i>	2	-	-	2	1	1	6
Especies por cada sección	10	6	11	8	11	8	
Total	17	13	21	17	18	14	100

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

7.4 Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se construyeron para cada sitio de muestreo (IRBIO Estado de Chiapas y COLPOS Estado de México) y se obtuvieron con el método de Máxima Parsimonia (MP). Este método elige un árbol que explique las diferencias en las secuencias observadas, utilizando el menor número de cambios evolutivos. Los nodos terminales dentro de los árboles son los organismos de interés que se pretende estudiar y los nodos internos representan los ancestros comunes que comparten dos o más

taxones (Gregory, 2008). Para la elaboración de los árboles, se utilizaron 1000 repetición de bootstrap y se usó el algoritmo de TBR (Tree-Bisection-Regrafting).

En la Figura 14 se representa la distribución de los principales grupos bacterianos, se muestra las 57 secuencias del gen 16S rRNA obtenidas del aislamiento del tracto digestivo de *E. foetida* provenientes del IRBIO. Se observa que algunas especies del género *Bacillus*, están dentro de un mismo clado (*B. subtilis*, *B. safensis*, *B. pumilis*). No obstante, otras especies de este mismo género, como *B. flexus*, *B. megaterium* y *B. simplex*, comparten el mismo ancestro común, de acuerdo al análisis de MP resulta ser *Staphylococcus* sp. Esto indica que este gen conservado, para estas tres especies de bacilos, surgió a partir de algún *Staphylococcus*. Además, al igual que la morfología bacilar agrupa a diversas especies, las cinco cepas de *Solibacillus* sp. presentes en los vermes del IRBIO revelan cercanía con el género *Bacillus*, los cuales surgen a partir del género *Paenibacillus* sp.

Arthrobacter sp. se agrupa dentro de otro clado pero muestra cercanía con los bacilos. Sin embargo, el análisis de MP muestra que hay otra grande rama separada de los bacilos. Este clado incluye a *Aeromonas media*, *Pantoea agglomerans* y *Acinetobacter lwoffii* los cuales están emparentados a partir de *Stenotrophomonas* sp. La especie de *Halarchaeum acidiphilum*, se utilizó para enraizar el árbol, ya que esta lejanamente emparentado a nuestros taxones de interés.

La Figura 15 presenta una visión de conjunto de los principales grupos taxonómicos bacterianos aislados del tracto digestivo de *E. foetida* provenientes del COLPOS, Estado de México. El árbol filogenético está basada fundamentalmente en el análisis del gen 16S rRNA, y presenta 45 secuencias de los aislamientos bacterianos. Se observa que algunas especies del género *Bacillus* están dentro de un mismo clado (*B. sp* y *B. subtilis*). No obstante, otras especies de este mismo género, como *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. safensis*, *B. aryabhatai*, *B. cereus* y *B. stratosphericus*, comparten el mismo ancestro común, de acuerdo al análisis de MP resulta ser *Staphylococcus warneri*.

Esto indica que este gen conservado, para estas cinco especies de *Bacillus*, surgió a partir de algún *Staphylococcus warneri*. Además, al igual que la morfología de bacilos agrupa a diversas especies, todas estas especies de *Bacillus*, surgen a partir de especies de *Paenibacillus* sp. Sin embargo, el análisis de MP muestra que hay otra grande rama separada de los *Bacillus*. Este clado incluye a *Aeromonas media*, y *Acinetobacter lwoffii* los cuales están emparentados a partir de *Stenotrophomonas* sp. La especie de *Halarchaeum acidiphilum*, se utilizó también para enraizar el árbol ya que esta lejanamente emparentado a los taxones de interés. El análisis de los arboles indica que existe diversidad de bacterias en el tracto digestivo de *E. foetida* de ambos sitios.

La diversidad filogenética demuestra que es importante realizar la secuenciación del gen 16S rRNA de las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de la lombriz de tierra *E. foetida*. En cada árbol filogenético se muestra la existencia de diversidad bacteriana entre IRBIO y COLPOS, se observan grupos con distancias de similitud, lo que indica que estas cepas pertenecen a diferentes taxones. Finalmente, el estudio de la secuencia genética del gen 16S rRNA, puede emplearse como huella digital para el estudio de microorganismos.

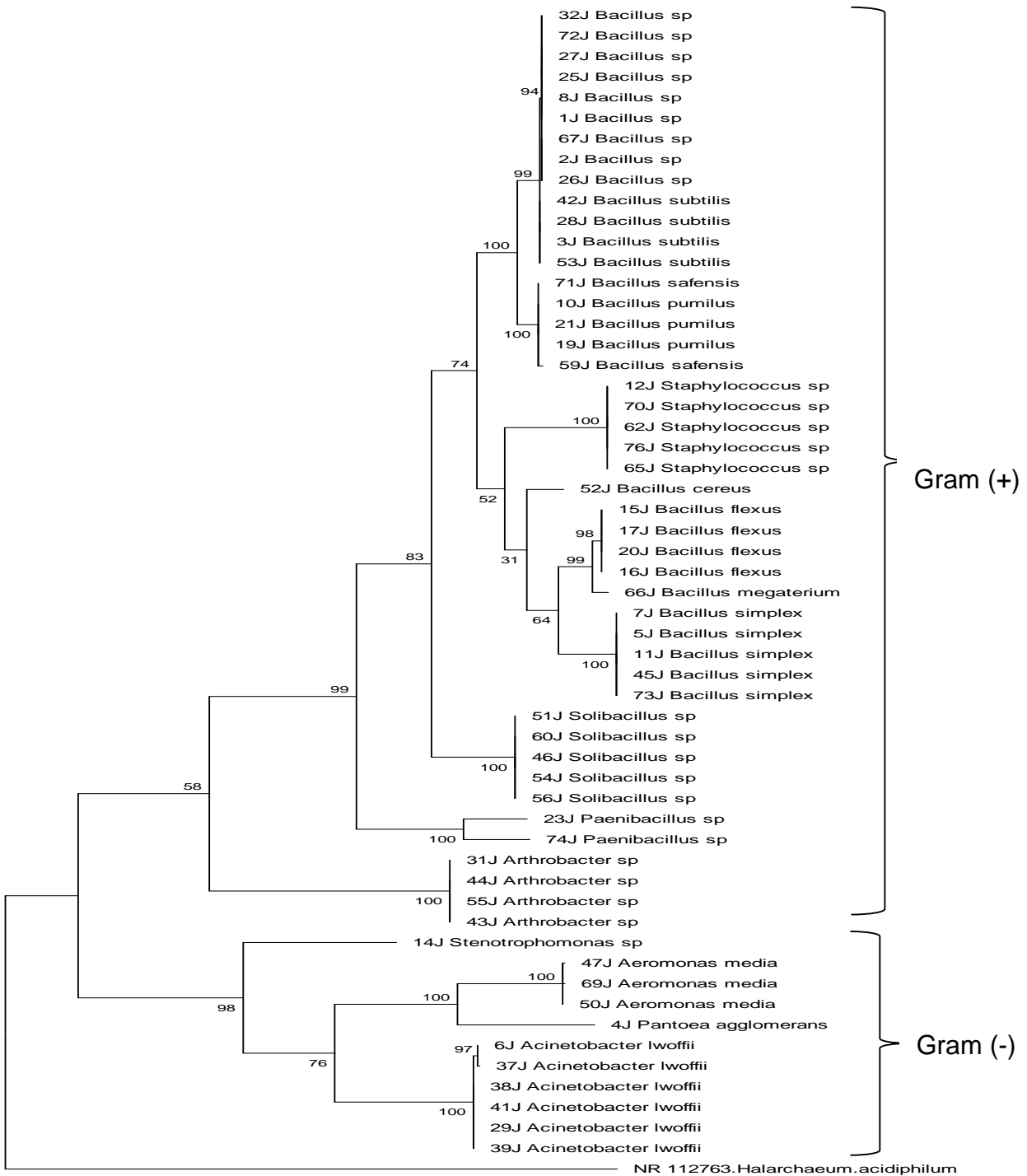


Figura 14. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen16S rRNA, obtenido con el método Máxima Parsimonia. Las bacterias se aislaron del intestino de *Eisenia foetida* proveniente del IRBIO, Estado de Chiapas. El análisis incluyó 57 secuencias nucleóticos. El índice de consistencia fue de 0.607890, el índice de retención de 0.901973 y el índice compuesto 0.598406 para todos los sitios informativos.

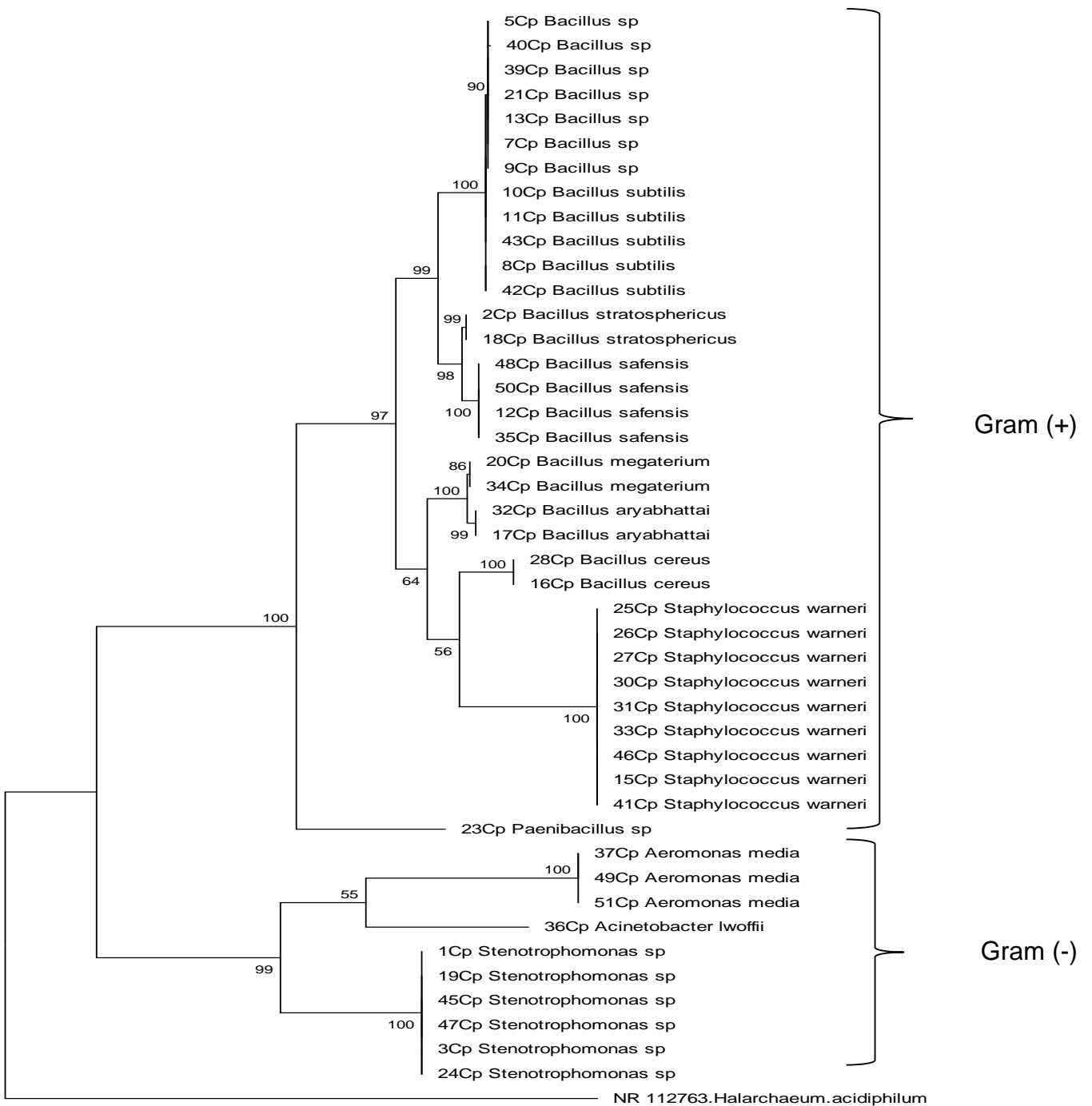


Figura 15. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen 16S rRNA, intestino de *Eisenia foetida* proveniente de COLPOS, Estado de México. El análisis incluyó 45 secuencias nucleótidos. El índice de consistencia fue de 0.697309, el índice de retención de 0.927575 y el índice compuesto 0.709227 para todos los sitios informativos.

7.5 Análisis de la actividad enzimática de las bacterias

Las pruebas bioquímicas realizadas con el kit API 20NE de BioMerieux®, a las bacterias del tracto digestivo de *E. foetida* muestran variación con respecto al sitio de procedencia de las lombrices. Se determinó la reacción espontánea y la revelada mediante la adición de reactivos, como lo marca el protocolo del fabricante. La Figura 16 ilustra ejemplos de los resultados obtenidos de estas pruebas bioquímicas.

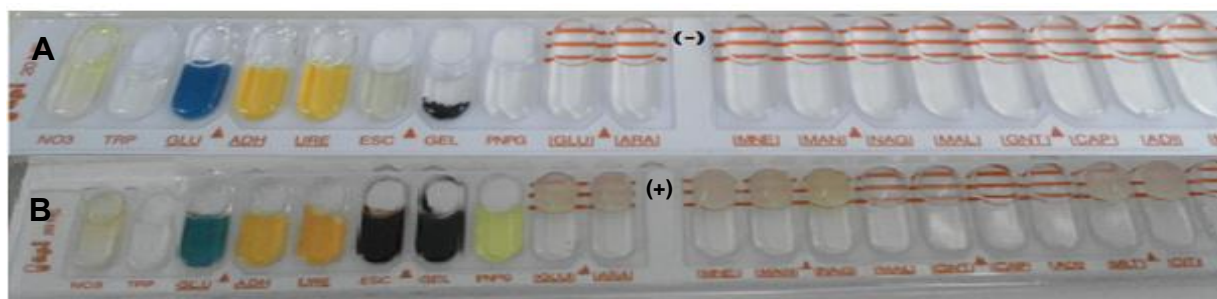


Figura 16. Determinación de la actividad enzimática bacteriana con el sistema API 20NE (BioMerieux®) **A)** Prueba negativa y **B)** Prueba positiva.

En el Cuadro 8 se resumen las actividades enzimáticas obtenidas de las bacterias Gram negativas aisladas del tracto de *E. foetida* con el API® 20NE. Se observa que no todos los géneros presentaron actividad enzimática para la catalasa, oxidasa, proteasa, citrato permeasa, adenina descarboxilasa y cisteinasa.

Cuadro 8. Actividad enzimática de géneros de bacterias Gram negativas aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida* empleando el kit API® 20NE.

BACTERIAS	CAT	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	CAP	MLT	CIT
<i>Arthrobacter</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aeromonas</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Acinetobacter</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+

Actividad catalasa (CAT), Hidrolisis de esculina por β -glucosidasa (ESC), hidrolisis por proteasas (GEL), actividad β -galactosidasa (PNPG), Asimilación de glucosa (GLU), Asimilación de arabinosa (ARA), Asimilación de manosa (MNE), Asimilación de manitol (MAN), Asimilación de caprato (CAP), Asimilación de malato (MLT), Asimilación de citrato trisódico (CIT). Positiva (+) y Negativa (-).

El género *Arthrobacter* hidrolizó la esculina por acción de la β -glucosidasa (misma que resulto positiva para el género *Stenotrophomonas*), además los resultados muestran

que este género puede asimilar algunos compuestos como el manitol, caprato y malato. No obstante, no presenta actividad proteasa, ni β -galactosidasa, ni de hidrólisis de los carbohidratos glucosa, arabinosa y manosa. Según Eschbach *et al.* (2003) el género *Arthrobacter* tiene la capacidad de crecer en ausencia de oxígeno provocando la reducción del nitrato a amonio y puede encontrarse fundamentalmente en el suelo.

El género *Stenotrophomonas*, está ampliamente difundida en el ambiente y es de tipo Gram negativa. Sus características coloniales son de color amarillo (en medio BHI) e intrínsecamente resistente a múltiples familias de antibacterianos, incluyendo inhibidores de β -lactamasas y carbapenémicos, por la producción de metalo β -lactamasa de metabolismo oxidativo (Watanabe, 1999). Este género tiene actividades positivas en la catalasa, proteasa, β -galactosidasa; y también asimila los sustratos glucosa, arabinosa, manosa y manitol.

El género *Aeromonas* incluye bacterias Gram negativas y anaerobias facultativas que morfológicamente se asemejan a los miembros de la familia Enterobacteriaceae (Popoff, 1984). Este género tiene actividades positivas en la catalasa y β -galactosidasa; y también asimila los sustratos arabinosa, caprato y malato.

Por otro lado, el género *Acinetobacter* se distribuye ampliamente en la naturaleza. Son bacterias Gram negativas que pertenecen al filo Proteobacteria. Presenta actividad β -galactosidasa y asimila manitol, caprato, malato y citrato. De esta manera, algunas especies pueden ser utilizadas para la obtención de productos como: lipasas, proteasas, cianoficina, bioemulsificantes y numerosos polímeros (Abdel-El-Haleem, 2003).

Además, se presenta en el cuadro 9, las actividades enzimáticas de cada sección A, B y C del tracto digestivo de *E. foetida* de ambas regiones. La sección C presentó mayor actividad enzimática, se considera la parte final del aparato 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.

Cuadro 9. Actividad enzimática de cada sección del tracto digestivo de *Eisenia foetida* con el kit API® 20NE.

Actividad enzimática	Sección A		Sección B		Sección C	
	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²
Catalasa	-	+	-	+	+	+
Proteasa	-	+	-	+	+	+
β-glucosidasa	-	+	+	-	+	+
β-galactosidasa	+	+	-	+	-	+
Asimilación de Glucosa	-	+	-	+	+	-
Asimilación de Arabinosa	+	-	-	+	+	+
Asimilación de Manosa	+	-	+	-	+	-
Asimilación de Manitol	-	-	+	-	+	+
Asimilación de Caprato	+	+	-	+	-	+
Asimilación de Malato	+	-	+	+	-	+
Asimilación de Citrato	+	-	+	-	+	+

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

Se realizaron las pruebas bioquímicas con BioMerieux® API 50CHB para las especies de *Bacillus* (Figura 17). El género *Bacillus* es el grupo de bacterias Gram positivas que está ampliamente distribuido en el suelo (Aslim *et al.*, 2002).

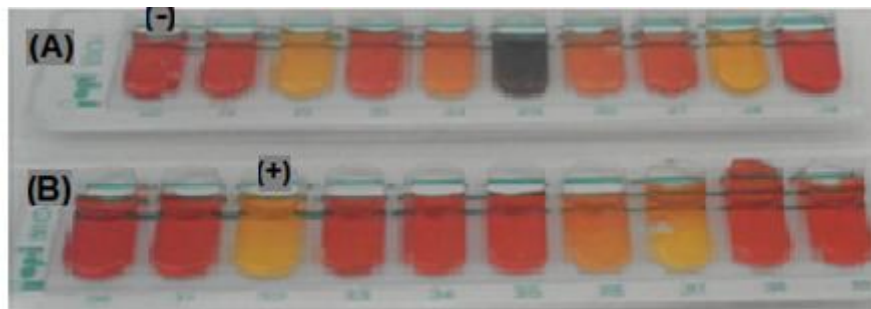


Figura 17. Asimilación bacteriana de las fuentes de carbono empleadas en el sistema API 50CHB (BioMerieux®) **A)** Prueba negativa y **B)** Prueba positiva.

En el Cuadro 10 se observa que *Bacillus* sp, tuvo actividad enzimática sobre la glucosa, la N-acetil-glucosamina, arabinosa, esculina, salicina, maltosa, trehalosa, inulina, almidón y glicógeno. *B. subtilis* presentó actividad enzimática sobre fructosa, esculina, sacarosa, trehalosa y glicógeno. Además, *B. cereus* tuvo actividad enzimática positiva con glicerol, ribosa, glucosa, fructosa, esculina, maltosa, sacarosa, rafinosa y glicógeno. *B. megaterium* ha sido reportada como la bacteria más común en la rizósfera de diversas plantas y en diferentes sistemas (Costa *et al.*, 2006). Esta especie presentó

actividad sobre la esculina, maltosa, salicina, celobiosa, sacarosa, trehalosa y tagatosa. La especie *B. safensis* exhibió actividad enzimática con el glicerol, glucosa, manosa, manitol, amigdalina, esculina, salicina, celobiosa, sacarosa, trehalosa y tagatosa. Para *B. pumilus* las actividades positivas fueron observadas en manitol, arabinosa, sacarosa y tagatosa. Las enzimas presentes en *B. simplex* presentaron reacción con manosa, manitol, esculina, amigdalina, salicina, sacarosa, farinosa y glicógeno. *B. aryabhatai* tuvo reacciones sobre la amigdalina, esculina, salicina, sacarosa y trehalosa.

La especie *B. flexus* presentó actividad enzimática con glucosa, fructosa, manosa, amigdalina, arabinosa, esculina, salicina, trehalosa, rafinosa y glicogeno. El género *Paenibacillus* sp. (Bacterias Gram positivas, no patógenas) se localiza en distintos ambientes como el suelo, rízofera de las plantas y sedimentos marinos (Timmusk *et al.*, 2005; Ravi *et al.*, 2007). En las pruebas realizadas en este trabajo se observó actividad positiva sobre la esculina, salicina y sacarosa. Guinebretiere *et al.* (2001) realizaron un estudio en el que identificaron 119 aislados de *Bacillus* mediante el sistema API 50CHB y 20E y técnicas moleculares, reportando resultados similares a los encontrados en la presente investigación

Cuadro 10. Actividad enzimática de *Bacillus* aisladas del tracto digestivo de *Eisenia foetida* empleando el kit el API® 50CHB.

BACTERIAS	GLI	RIB	GLU	FRU	MaN	MAN	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	SAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLIG	TAG
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>Bacillus safensis</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-		+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus simplex</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus flexus</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Paenibacillus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Glicerol(GLI), Ribosa(RIB), Glucosa (GLU), Fructosa (FRU), Manosa (MaN), Manitol (MAN), N-acetil-glucosamina(NAG), Amigdalina (AMY), Arabinosa (ARE), Esculina (ESC), Salicina (SAL), Celobiosa (CEL), Maltosa (MAL), Sacarosa (SAC), Trehalosa (TRE), Inulina (INU), Rafinosa (RAF), Almidón (AMD), Glicógeno (GLIG), Tagatosa (TAG). Positiva (+) y Negativa (-).

Finalmente en el Cuadro 11 se presenta la actividad enzimática de cada sección A, B y C, presentando mayor actividad en las secciones B y C del tracto digestivo de *E. foetida* para IRBIO y COLPOS. La sección B es la región en la que probablemente comienza la selección y donde se incrementan el número de colonias bacterianas y las reacciones enzimáticas de parte de los microorganismos. Aunque en la región C continúa el proceso de la selección, se observa la disminución de bacterias en el proceso de la degradación de la materia orgánica e inorgánica. Las secciones B y C conforman la parte del sistema digestivo, en donde puede haber una inhibición o selección de la microbiota para degradar el sustrato orgánico e inorgánico.

Diversos estudios indican que la microbiota asociada a las lombrices de tierra son responsables de la degradación de la materia orgánica por lo que dependiendo del sustrato (dieta) de las lombrices, se favorece diferente actividad metabólica en el intestino (Knapp *et al.*, 2008). Lo anterior se ha demostrado en esta investigación ya que IRBIO presenta diferente capacidad metabólica con respecto a COLPOS en las tres zonas de aislamiento A, B y C. Siendo menor actividad metabólica en IRBIO con respecto al COLPOS, lo que debe estar relacionado a la diferencia en la riqueza de sustratos de alimentación favoreciendo una composta con riqueza en actividad metabólica microbiana.

Cuadro 11. Asimilación de fuentes de carbono por las bacterias de cada sección del tracto digestivo de *Eisenia foetida* el kit el API® 50CHB.

Actividad Enzimática	Sección A		Sección B		Sección C	
	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²	IRBIO ¹	COLPOS ²
Glicerol	-	-	-	+	+	+
Ribosa	-	-	-	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	-
Manosa	-	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+	-	+
N-acetil-glucosamina	+	+	+	+	+	-
Amigdalina	-	+	+	+	-	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	-	-	-	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	+	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	+	-	-	+
Almidón	+	+	+	+	+	+
Glicógeno	+	+	+	+	+	+
Tagatosa	+	-	+	+	-	+

¹ Instituto de Reconversión Productiva y Bioenergética, Estado de Chiapas

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México

VIII. CONCLUSIONES

Se observó similar morfología colonial bacteriana en el tracto digestivo de la lombriz de tierra *E. foetida*, proveniente de ambas instituciones (IRBIO y COLPOS). No obstante, la morfología colonial rizoide se encontró solamente en bacterias aisladas de lombrices provenientes del IRBIO.

El análisis microscópico reveló que, la población bacteriana estuvo compuesta por 44 cepas Gram negativas y 56 Gram positivas

El mayor número de cepas bacterianas en el tracto digestivo de *E. foetida* de ambas instituciones se observó en la sección B, que es la parte en la que se lleva a cabo la posible selección de especies bacterianas y donde comienza la degradación del alimento.

En tracto digestivo de *E. foetida* proveniente del IRBIO se identificaron nueve géneros bacterianos: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Solibacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*; y seis en los individuos provenientes del COLPOS: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*.

El género que predominó fue *Bacillus* con 10 especies (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. simplex*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. flexus*, *B. aryabhatai*, *B. safensis* y *B. stratosphericus*) que estuvieron presentes en alguna de las secciones (A, B y C) del intestino de *E. foetida* proveniente de ambas instituciones.

La bacteria *Bacillus* sp., predominó en las secciones A, B y C del tracto digestivo de *E. foetida* procedente de IRBIO y del COLPOS con un total de 16 aislamientos. Las especies *Bacillus simplex*, *Solibacillus* sp, *Arthrobacter* sp., predominaron en las tres secciones A, B y C del tracto digestivo de los ejemplares provenientes del IRBIO con un frecuencia de 5, 5 y 4, respectivamente. En cambio, *Staphylococcus warneri* predominó

en las tres secciones del tracto digestivo de *E. foetida* proveniente del COLPOS, con una frecuencia de 9

En los individuos de *E. foetida* de ambas instituciones se observaron diferencias filogenéticas entre las especies bacterianas aisladas del tracto digestivo. Estas diferencias podrían deberse a la dieta alimenticia a la que fueron sometidos. Los ejemplares provenientes de IRBIO fueron alimentados con pastos y estiércol de bovino, mientras que los del COLPOS lo hicieron con residuos orgánicos (cáscaras de frutas, residuo de hortalizas y cascarón de huevo).

Existen pocos estudios sobre el papel de la microbiota, particularmente las bacterianas, en el intestino de la lombriz de tierra. Se ha enfatizado la actividad enzimática de las bacterias como la responsable de digerir directamente compuestos como la celulosa, lignina, taninos y complejos húmicos del suelo. Pero hasta ahora, no hay información precisa sobre la interacción entre las diferentes poblaciones microbianas en el tracto digestivo, como podrían ser antibiosis, parasitismo, sinergismo. La actividad enzimática detectada de los géneros presentes en el tracto digestivo de *E. foetida*, habilita a las bacterias a degradar y reducir compuestos orgánicos como la celulosa, hemicelulosa, lignina, quitina, pectina, proteínas, péptidos, lípidos y peptidoglicano.

Esta investigación es la base de estudios futuros tendientes a entender la diversidad bacteriana del tracto digestivo de la lombriz de tierra *E. foetida* con la idea de mejorar la biotecnología del vermicompostaje. Existe la posibilidad de modificar la flora bacteriana del verme, favoreciendo la presencia de especies bacterianas más eficientes en la transformación de la materia orgánica o en la detoxificación compuestos xenobióticos.

XI. LITERATURA CITADA

- Abd El-Haleem D., Moawad H., Zaki E., Zaki S. 2002a. Molecular characterization of phenol-degrading bacteria isolated from different Egyptian. *Microbial ecology* 43:217-224.
- Acevedo, C., Pelaez J., Gasca G., Guzman C. 1998. Tecnología para la producción de lombricompuesto.
- Aira, M., Domínguez J. 2008. Optimizing vermicomposting of animal wastes: effects of dose of manure application on carbon loss and microbial stabilization. *Journal of Environmental Management* 88:1525-1529.
- Aira, M., Domínguez J. 2009. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). *Journal of Hazardous Materials* 161: 1234-1238.
- Aira, M., Domínguez J., Monroy J., Velando A. 2007. Stress promotes changes in resource allocation to growth and reproduction in a simultaneous hermaphrodite with indeterminate growth. *Biological Journal of Linnean Society* 91: 593-600.
- Aira, M., Monroy F., Domínguez J. 2006a. Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867). *Biology and Fertility of Soils* 42: 371-376.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del suelo. Segunda edición, Libros y editoriales S.A. México, D.F. 491p.
- Anderson, J.T., Grande F., Keys A. 1999. Independence of the effects of cholesterol and degree of saturation of the fat in the diet serum cholesterol in man. *Journal of Clinical Nutrition* 29:1184-1189.
- Aslim, B., Yuksekdağ, Z., Beyatlı, Y. 2002. Determination of PHB growth Quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* 19: 24-30.
- Barot, S., Ugolini A., Brikci F. 2007. Nutrient cycling efficiency explains the long-term effect of ecosystem engineers on primary production. *Functional Ecology* 21:1-10.
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Sayers, E. W. 2009 [GenBank](#). *Nucleic Acids Research* 37:D26–D3.

- Blanchart, E., Lavelle P., Spain A. 1989. Effects of two species tropical earthworms (*Oligochaeta: Eudrilidae*) on the size distribution of aggregates in an African soil. *European journal of soil biology* 26: 417-425.
- Brito-Vega, H. 2010. Diversidad genética de bacterias del tracto digestivo de la lombriz de tierra. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Brito-Vega, H., Espinosa-Victoria D. 2009. Bacterial Diversity in the Digestive Tract of Earthworms (*Oligochaeta*). *Journal of Biological Sciences* 9:192-199.
- Brito-Vega, H., Espinosa-Victoria D., Barois I., Gómez-Vázquez A., Lavelle P. 2010. Genetic identification of bacteria isolated from the digestive tract of the earthworm *Pontoscolex corethurus*. 9Th International Symposium on Earthworm Ecology. September, 2010. Xalapa, Veracruz, México.
- Brown, G., Barois I., Lavelle P. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity the drilosphere and the role of interactions. *Journal of Soil Biology* 38:177-198.
- Brown, G.G., Doube B.M. 2004. Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. En Edwards, C.A. (Eds.) *Earthworm ecology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. 213 p.
- Byzov, B.A., Khomykov N.V., Kharin S.A., Kurakov. A.V. 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of eartworms. *Journal of Soil Biology* 43:146-156.
- Chaussod, R., Houot S., Guiraud G., Hétier J.M. 1988. Size and turnover of the microbial biomass in agricultural soils: laboratory and field experiments. *In: Nitrogen efficiency in agricultural soil*. Eds. K.A. Smith and D.S. Jenkinson 321-326 p. *Applied Sciences*. Elsevier, London.
- Contreras-Ramos, S., Ivarez-Bernal D., Dendooven L. 2008. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia foetida*). *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1954–1959.
- Contreras-Ramos, S., Ivarez-BernalD., Dendooven L. 2006. *Eisenia foetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution* 141:396-401. desarrollo. Lombricultura Técnica Mexicana, México.140 p.

- Costa, J.M., Argolo AM., Felix M. 2006. Redescription of *Triatoma melanica Neiva and Lent*, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- Cristales, O. 2000. Módulo de capacitación de la Lombricultura. Fundación ABA. San Salvador, El Salvador 15-58 p.
- Curry, J.P., Schmidt O. 2007. The feeding ecology of earthworms- A review. *Pedobiologia* 50:463-477.
- Daqui N.C., Leblanc H.A y Russo R.A. 2007. Distribución espacial de carbono, nitratos y amonio en estructuras biogénicas en un bosque secundario de la región tropical húmeda de Costa Rica. *Tierra Tropical* 3: 12-25.
- Domínguez J., Parmelee R.W., Edwards C.A. 2003. Interactions between *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. *Pedobiologia* 47: 53-60.
- Domínguez, J. 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research, in: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology* (2nd edition), CRC Press, Boca Raton. 401-424.
- 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: 20-31.
- Drake, H.L., Horn M.A. 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology*. 61:169.
- Edwards, A.C., Lofty J.R. 1977. *Biology of earthworms*. (Ed): Chapman and Hall. Boca Raton, London 1-261p.
- Eivazi, F., Tabatabai M.A. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 2:167-172.
- Eschbach, W., Nogler, P., Schär, E., Schweingruber F.H. 2003. Technical advances in the radiodensitometrical Determination of Wood Density. *Dendrochronologia* 13: 155-168.
- Espinosa-Victoria, D. y H. Brito-Vega. 2010. Relaciones anisimbióticas y la transformación del material orgánico del suelo. In: *Agricultura orgánica*. Tercera

- Parte. ISBN 978-607-00-3411-4. Editores: J.L. García H., E. Salazar S., I. Orona C., M. Fortis H. y H.I. Trejo E. Universidad Juárez del Estado de Durango: 29-50.
- Flegel, M., Schrade S. 2000. Importance of food quality on selected enzyme activities in earthworm casts (*Dendrobaena octaedra*, Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* 32:1191-1196.
- Fragoso, C. 2001. Las lombrices de tierra de México (ANNELIDA, OLIGOCHAETA): diversidad, ecología y manejo. *Acta Zoologica Mexica*, Numeroespecial 1:131-171.
- Fragoso, C. 2007. Diversidad y patrones biogeográficos de las lombrices de tierra de México (Oligochaeta, Annelida). *In* *Minhocas na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*, G. G. Brown y C. Fragoso (eds.). EMBRAPA Soja. Londrina 107-124 p.
- Fragoso, C., Rojas P. 2009a. A new ocneroдрilid earthworm genus from Southeastern Mexico (Annelida: Oligochaeta), with a key for the genera of *Ocneroдрilidae*. *Megadrilologica* 13:141-152.
- Garbeda, P., van Veen J.A., Van Elsas J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42:243-70.
- Gheisari, S., Danesh S., Mousavi S.M. 2010. Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in vermicomposting of organic fraction of municipal solid wastes. *Asian Journal of Chemistry* 22: 1266-1274.
- Gómez, M. L., Vivas, L. J., Ruiz R., Reyes V., Hurtado C. A. 2006. Bacterias marinas nativas. *Suelos Ecuatoriales*. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo 39: 40-44.
- Gregory, TR. 2008. Understanding evolutionary trees. *Evolution. Education and Outreach* 1: 121-137.
- Guinebretiere, M.H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., and Nguyen-The, C. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4520–4530.
- Gupta, R., Garg V. 2009. Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing *Eisenia foetida*. *Journal of Hazardous Materials* 162: 430–439.

- 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* 25:669-676.
- Horn, M.A., Schramm A., Drake H.L. 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 69: 1662-1669.
- Howe, H.F. 1984. Constraints of the evolution of mutualism. *American Naturalist* 123: 764-772.
- Huerta, E., Rodríguez-Olá J., Evia- Castillo I., Montejo-Meneses E., de la Cruz-Mondragó, M., Gracia-Herández R. 2005. La diversidad de lombrices de tierra (ANNELIDA, OLIGOCHAETA) en el estado de Tabasco, México, Universidad y Ciencias. 21:73-83.
- 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 Latino Americano* 26:171-181.
- Hyung-Jung, K., Kwang-Hee S., Chang-Jun C., Hor-Gil H. 2004. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia foetida*) Intestine. *Chemistry and Biotechnology* 47: 137-142.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agror). 2008. Tecnologías innovativas Apropriadas a la Conservación in situ de la Agrobiodiversidad. Producción y uso del humus de lombriz. Perú-Lima. Consultado 24 Mayo.2012. Disponible en <http://www.redisa.uji.es/artSim2008/tratamiento/A20.pdf>.
- Janzen, D.H. 1985. Natural history of mutualism. In: *Biology of mutualism. Ecology and evolution*. Ed. D.H. Boucher. 40-99. Croom, Helm, London, Sydney.
- Jayasinghe, B.A., Parkinson D. 2009. Earthworms as the vectors of *actinomycetes* antagonistic to litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology* 43:1.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56: 73–98.
- Knapp, B.A., Seeber J., Podmirseg S.M., Meyer, E., Insam H. 2008. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for analyzing the gut microflora of

- Lumbricus rubellus* Hoffmeister under different feeding conditions. *Applied Entomology and Zoology* 98: 271-
- Křišťůfek, V., Ravasz K., Pizl V. 1994. Ultrastructural analysis of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoff. (Annelida, Lumbricidae). *Acta Microbiol. Immunol. Hung* 41: 283-290.
- 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., Decaens 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: 3-15.
- Lavelle, P., Lattaud C., Trigo D., Barois I. 1995. Mutualism and biodiversity in soil. 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., Spain, A.V. 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, London. UK.
- Lewis, P. O. 2001. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 30-37.
- Li, J.H., Wang E.T., Chen W.F., Chen W.X. 2007. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule entophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology Biochem* 40:238-246.
- Logan, N. A., Berkeley, R. C. W. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Journal of general microbiology Society* 130:1871–1882.
- López-Hernández, J. 2007. Detección de bacterias del tracto digestivo de la lombriz roja californiana por PCR. Tesis de Licenciatura. UPIBI. IPN.
- Lores, M., Gómez, M., Pérez D., Domínguez J. 2006. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2993-2996.
- Malcolm, R., Inder B.J., Saxena M. 2000. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 57-67.
- Márialigeti, K. 1979. On the community-structure of the gut-microbiota of *Eisenia lucens* (Annelida, Oligochaeta). *Pedobiologia* 19: 213-220.

- Mendez, R., Borges S., Betancourt C. 2003. A microscopical view of the intestine of *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta:Glossoscolecidae). *Pedobiologia* 47: 900-903.
- Mendoza, L. 2008. Manual de lombricultura. CECYTECH-DG-UI-ENC-001. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. [en línea]<http://www.cecyltech.edu.mx/Pdf/manuallombricultura>.
- Merino-Trigo, A., Sampedro L., Rodriguez-Berrocal F.J., Mato S., Páez de la Cadena M. 1999. Activity and partial characterisation of xylanolytic enzymes in the earthworm *Eisenia andreife* from organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1735-1740.
- Molinares, R. 2006. Identificación y caracterización de las bacterias asociados a la pared intestinal de *onychochaeta borincana* (oligochaeta: glossoscolecidae). Universidad de Puerto Rico. Biología.
- Moore, J.C., Berlow E.L., Colema Popoff, M. 1984. Genus III *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936 398AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams and Wilkins.545–548.
- Moore, J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., de Ruiter P.C., Dong Q., Johnson N.C., McCann K.S., Melville K., Morin P.J., Nadelhoffer K., Rosemond A.D., Post D.M., Sabo J.L., Scow K.M., Vanni M.J., Wall D.H. 2004. Detritus, Trophic Dynamics and Biodiversity. *Ecology Letters* 7: 584–600.
- Panigrahi, A.K. 2009. Earthworms and their role in soil fertility enhancement. Disponible: <http://www.articlesbase.com/environment-articles/earthworms-and-their-s-role-in-soil-fertility-enhancement-1054001.html>. [Consultado: 12-de Agosto 2012].
- Parle, J. N. 1963. Micro-organisms in the intestine of earthworms. *General Microbiology* 31:1-11.
- Ravi, B., Sujatha S. 2007. Soil fertility status as influenced by arecanut based cropping system and nutrient management. *Journal of Plantation Crops* 35:158–165.
- Repetto, F. 2005. Variaciones en la comunidad microbiana total de fragmentos, debido a cambios abióticos diferenciales según la matriz que los rodea. Lic. Ciencias Ambientales con Mención en Biología, Curso de Ecología de Ambientes Fragmentados. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.

- Righi, G. 1992. Four new peruvian earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 24:1223-1230.
- Saharan, B.S., Nehra V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. *Medical Research* 21:1-30.
- Sampedro, L., Dominguez J. 2008. Stable isotope natural abundances ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of the earthworm *Eisenia foetida* and other soil fauna living in two different vermicomposting environments. *Applied Soil Ecology* 38:91-99.
- Sanchez-Martin, M.J., Feliciangeli M.D., Campbell-Lendrum D., Davies C. 2006. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by *sylvatic Rhodnius prolixus* bug populations? *Trop Med Int Health* 11: 1585-1593.
- Schaefer, M. 2003. Behavioral endpoints in earthworm ecotoxicology. Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *Journal of Soils and Sediments* 3:79-84.
- Sharan, A., Shikha, Singh Darmwal, N., Gaur, R. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline–alkali soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 753-759.
- Silva, R.I., Negri R.M., Lutz V. A. 2009. Summer succession of ultraphytoplankton
- Rodríguez, R. 2010. Aprovechamiento de residuos orgánicos a través de composteo y lombricomposteo. U.A.A.A.N. Departamento de Fitomejoramiento [en línea] http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/aprov_residuos.pdf. 24 de Noviembre.
- Singleton, D.R., Hendrix P.F., Whitman W.B. 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 35:1547-1555.
- Souto, G., Correa O., Montecchia M., Kerber N., Pucheu N., Bachur M., García A. 2004. Genetic and Functional Characterization of a *Bacillus* sp. Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified As Iturin-Like Compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97:1247-1256.

- Swift, M.J., Heal O.W., Anderson J.M. 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. UK.
- 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.
- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tejada, M., Masciandaro G. 2011. Application of organic wastes on a benzo (a) pyrene polluted soil. Response of *soil biochemical* properties and role of *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ Safe* 74: 668–674.
- Timmusk, S., Grantcharova N., Wagner E.G.H. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7292-7300.
- Tineo, B. 1994. Crianza y manejo de la lombriz con fines agrícolas. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 18 P.
- Torsvik, V., Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.
- Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva T.A, Klimova S.Y., Shestakov Al., Botina S.G., Netrusov A. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology* 88: 655-664.
- Valle-Molinares, R., Borges S., Rios-Velázquez C. 2007. Characterization of possible symbionts in *Onychochate boricana* (Annelida:Glossoscolecidae). *Soil Biology* 43:14-18.
- Venter, J.C., Remington K., Heilderberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D.Y., Pulsen I., Nelson, K.E., Nelson W. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- 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.

- Viljoen, S. A., Reinecke J.A., Hartman L. 1992. The influence of temperatura on the life-cycle of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 24:1341-1344.
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., Ryder, M. H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*. 40: 36–43.
- Watanabe, K. 1999. «Nosocomial infections due to *Stenotrophomonas maltophilia*. *Inter. Med* 38:1079-9664.
- 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 Ecology* 3:199-208.
- Widmer, F., Shaffer B.T., Porteus L.A., Seidler R.J. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Applied and Enviromental Microbiology* 65:374-380.
- Zaidi, A., Khan M. S., Ahemad M., Oves M., Wani P. A. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors). *Microbial strategies for crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin 23-50 pp.
- Zani, S, Mellon M.T., Collier J.L., Zher J.P. 2000. Expresion of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Applied and Enviromental Microbiology* 66:3119-3124.
- Zhang, X., Wang J., Xie H., Wang J., Zech W. 2003. Comparison of organic compounds in the particle-size fractions of earthworm casts and surrounding soil in humid Laos. *Applied Soil Ecology* 23:147-153.