

Procedimientos para identificar bacterias y aislamiento en lombriz de tierra

C O L E C C I Ó N

JOSÉ N. ROVIROSA

Biodiversidad, desarrollo sustentable y trópico húmedo

José Manuel Piña Gutiérrez

Rector

Alma Catalina Berumen Alatorre

Directora de la División Académica de Ciencias Agropecuarias

Procedimientos para identificar bacterias y aislamiento en lombriz de tierra

Hortensia Brito-Vega
David Espinosa-Victoria
Armando Gómez-Vázquez
Isabelle Barois-Boullard



Procedimientos para identificar bacterias y aislamiento en lombriz de tierra / Hortensia Brito-Vega...[et al.] .- 1ª Ed. – Villahermosa, Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2012.

47 p. – (Colección José N. Rovirosa. Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo).

Incluye Referencias Bibliográficas.

ISBN: 978-607-606-091-9

1. Lombrices – cultivo de \ 2. Lombricultura I. Título. II. Autor. II. Serie

L.C. SB998 .E4 P76 2012

Primera edición, 2012

D. R. © Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura,
Colonia Magisterial, C. P. 86040
Villahermosa, Centro, Tabasco.

Forma correcta de citar esta obra:

Brito-Vega H., Espinosa-Victoria D., Gómez Vázquez A., Barois-Boullard I. M. 2012. Procedimientos para identificar bacterias y aislamiento en lombriz de tierra. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco México. 47 p.

Queda prohibida la reproducción parcial o total de la presente publicación, sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y en su caso de tratados internacionales aplicables. Toda persona que infrinja esta disposición se hará acreedora a las sanciones correspondientes. El contenido y los puntos de vista expresados en los diversos trabajos que se presentan en este documento son responsabilidad exclusiva de los autores.

ISBN: 978-607-606-091-9

Evaluación Técnica y corrección de estilo: Consejo Editorial de la División Académica de Ciencias Agropecuarias.

Diseño institucional: Dirección de Difusión y Divulgación Científica y Tecnológica.

Hecho en Villahermosa, Tabasco, México.

Índice

| | Página |
|--|---------------|
| Introducción | 1 |
| El muestreo | 2 |
| Fijación de la lombriz de tierra | 5 |
| Aislamiento y purificación de bacterias | 8 |
| Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias | 14 |
| Sistema API® | 22 |
| Amplificación del gen 16S ARNr en procariontes | 26 |
| Anexo | 31 |
| Sobre los autores | 37 |
| Referencias | 39 |

Índice de Cuadros

| Cuadro | Contenido | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Tests de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria de las galerías API®NE20 y E20 BioMerieux®. | 24 |
| 2 | Primers universales para amplificar el ADN bacteriano | 28 |

Índice de Figuras

| Figura | Contenido | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Toma de muestra | 4 |
| 2 | Monolitos para extraer microfauna y lombrices de tierra | 5 |
| 3 | a) Lavado de lombriz de tierra, b) Líquido fijador y c) fijación de la lombriz | 7 |
| 4 | El sistema digestivo de la lombriz de tierra | 8 |
| 5 | Diluciones seriadas en medio de caldo Brain Heart Infusion o solución salina | 11 |
| 6 | Aislamiento de colonias de bacterias | 11 |
| 7 | Método de aislamiento por siembra por estría en placa | 12 |
| 8 | Preparación de las cajas de Petri | 13 |
| 9 | Colonias de bacterias aisladas y puras | 14 |
| 10 | Diferencia de la pared de la bacteria por la tinción de Gram positivo y negativo | 16 |
| 11 | Forma de las células bacterianas | 17 |
| 12 | Procedimiento para tinción de Gram positivas y negativas | 18 |
| 13 | Galería de Api 20 E pruebas negativas y positivas | 25 |
| 14 | Galería de Api 20 NE pruebas negativas y positivas | 25 |
| 15 | Galería de Api 50 CH pruebas negativas y positivas | 25 |

Introducción

Los suelos están constituidos con una diversidad de fauna (mega, macro y microorganismos), poco explorada y estudiada. Las lombrices de tierra (invertebrados y macroorganismos del suelo, cuyo ancho es $> 2000 \mu\text{m}$) y las bacterias (microorganismos que miden entre 0.5 y $5 \mu\text{m}$) que habitan en el suelo, establecen una relación mutualista (entre organismos de diferente morfología y tamaño), cuando estas últimas colonizan el tracto digestivo de las lombrices (Lavelle *et al.*, 1995). Parece que la gran mayoría de los invertebrados del suelo no poseen enzimas para digerir directamente la celulosa, lignina, taninos y complejos húmicos, en cambio estas enzimas, en su mayoría están presentes en las bacterias. Estos microorganismos son ingeridos por los invertebrados, para degradar los compuestos complejos por medio de sus enzimas (Lattaud *et al.*, 1998; Brito-Vega y Espinosa-Victoria, 2009). Las bacterias metabolizan el material orgánico degradado en el sistema digestivo de la lombriz de tierra, por medio de enzimas específicas del sustrato: las proteasas catabolizan las proteínas, la amilasa hidroliza el almidón; la xilanasas degrada el material vegetal (el xilano) y las celulasas rompen los enlaces de la celulosa. Además las enzimas influyen en la liberación específica de nutrientes y en la calidad del alimento que es asimilado en el cuerpo de la lombriz (Lavelle *et al.*, 1995).

El estudio de la identificación bacteriana con técnicas fenotípicas y genéticas permite obtener información sobre la composición, morfología, fisiología, estructura de poblaciones y de comunidades bacterianas. Mientras que el análisis de las secuencias de los genes que codifican el ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) ha permitido establecer firmas moleculares a varios niveles taxonómicos, utilizadas como base de la

identificación bacteriana por comparación filogenética (Grasso, 2006). El objetivo del presente manual es contribuir a la difusión y conocimiento de algunas técnicas fenotípicas y genéticas, para la identificación de los grupos bacterianos presentes en el contenido intestinal de la lombriz de tierra.

El muestreo

Introducción

En estadística, el muestreo es la selección de una muestra a partir de una población (Belsley, 2000). El muestreo estadístico se basa en el principio de probabilidad; es decir, aquel en que todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser elegidos para formar parte de una muestra y, por consiguiente, todas las posibles muestras de tamaño n tienen la misma probabilidad de ser elegidas (Belsley, 2000; Chacko y Yageen, 2008). A la estadística conciernen, principalmente, las conclusiones y predicciones resultantes de productos del azar que ocurren en experimentos o investigaciones planeados con cuidado. La mayoría de los métodos de inferencia que se estudian, están basados en la suposición de que se manipulan muestras aleatorias (Urquhart, 2007).

La metodología para calcular la biodiversidad de los macroorganismos y microorganismos del suelo, consiste en tomar una muestra de suelo de 10 a 15 cm de profundidad, de donde se analiza la morfología y la fisiología de las poblaciones, finalmente se aplican test morfofisiológicos (pruebas bioquímicas), generalmente específicas para el grupo de microorganismos, para posteriormente realizar los cálculos matemáticos adecuados al estudio (Furlong *et al.*, 2002).

Los métodos de muestreo se clasifican de acuerdo con el número de muestras tomadas de la población (Freedman *et al.*, 1978). Las principales ventajas de una muestra de juicio son la facilidad de obtenerla y el bajo costo (Infante y Zarate, 1991). También se puede considerar una muestra al azar cuando la manera de selección es tal, que cada elemento de la población tiene igual oportunidad de ser seleccionado. Una muestra aleatoria también se llama muestra probabilística, la cual generalmente es preferida por los estadísticos, ya que la selección de las muestras es objetiva y el error muestral puede ser medido en términos de probabilidad bajo la curva normal. Los tipos comunes de muestreo aleatorio son: simple, sistemático, estratificado y conglomerados (Infante y Zarate, 1991).

El desarrollo de los métodos de la biología molecular, ha cambiado el estudio de la microbiología (Torsvik *et al.*, 1990; Grasso, 2006; Bonilla-Rosso *et al.*, 2008). Se estima que sólo el 1 % de los microorganismos del suelo crecen en medios de cultivo, por lo que, si pretendemos valorar la diversidad total de microorganismos que existen en un ecosistema dado, no podemos sacar conclusiones válidas contando con sólo el 1 % de la población. Tratando de ampliar la muestra analizada se plantea otra alternativa: la muestra de suelo en cuestión no se siembra en medios de cultivo sino que se le extrae el ADN o una fracción determinada, se amplifica por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), se compara la ampliación por electroforesis y se analizan las secuencias en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), se realiza un BLAST, y se construye un fenograma genético. De esta forma se puede tener un valor más real de la diversidad de un ecosistema dado, para poder hacer comparaciones entre distintas muestras que pueden pertenecer a diferentes ambientes (Torsvik *et al.*, 1990; Grasso, 2006; Bonilla-Rosso *et al.*, 2008).

Toma de muestras

Para la toma de una muestra existen diferentes maneras de recorrer un lote con el objetivo de obtener una muestra representativa. La más sencilla consiste en recorrer el lote recolectando submuestras al azar. El inconveniente de este tipo de muestreo es que frecuentemente no se toma en cuenta la variabilidad existente en cabeceras y sectores no homogéneos del lote. Otro plan de muestreo consiste en dividir el campo en subunidades homogéneas (por ejemplo: loma y bajo), dentro de las cuales se toman muestras compuestas al azar, evitando cabeceras y cualquier heterogeneidad que pueda aparecer en el lote como sectores agrupados de varios tipos del suelo de menor calidad; este tipo de muestreo se conoce como muestreo al azar estratificado (Freedman *et al.*, 1978). Una variante es el muestreo de áreas de referencia, que consiste en muestrear intensamente un sector homogéneo del lote, que se asume representativo del lote completo. El tipo más intensivo de muestreo es el muestreo en grilla. Las muestras son tomadas a intervalos regulares en todas las direcciones, analizándose por separado (Anderson e Ingram, 1993).



Figura 1. Toma de muestra

El muestreo de macroorganismos como las lombrices de tierra se puede realizar en monolitos de 25 x 25 x 30 cm² (largo × ancho × profundidad), con tres o más repeticiones por parcela. Cada monolito se divide de en tres capas, de 0-10, 10-20 y 20-30 cm de profundidad (Figura 2). Además se puede tomar muestras para las determinaciones biológicas y físico-químicas del suelo como: textura, estructura, densidad aparente, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, calcio y potasio (Anderson e Ingram, 1993).

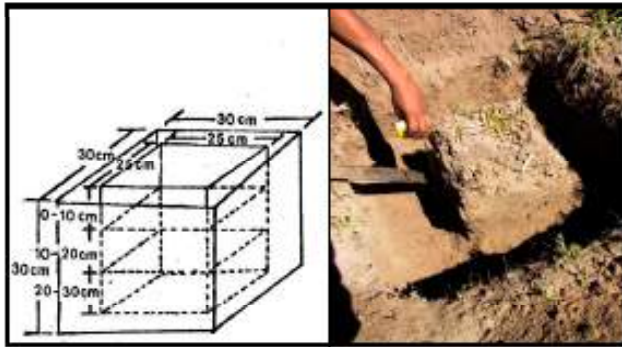


Figura 2. Monolitos para extraer microfauna y lombrices de tierra.

Fijación de la lombriz de tierra

Introducción

Se han descrito 93 especies de lombrices de tierra en México, de las cuales 46 son nativas y 47 exóticas (Fragoso, 2001). Las diferentes lombrices desarrollan distintas funciones en el suelo, por ejemplo las epigeas, son fragmentadoras de la hojarasca, mientras que las endogeas y anecicas producen efecto en la estructura del suelo al producir agregados (Blanchart *et al.*, 1997). En los ecosistemas naturales, como en las selvas, se registrada la mayor cobertura y diversidad vegetal, así como, la mayor diversidad de lombrices (Fragoso, 2001). Para realizar estudios de lombrices de tierra, los muestreos

pueden efectuarse bajo los lineamientos del texto titulado “Manual tropical soil biology and fertility” (Anderson e Ingram, 1993), con monolitos de 25 x 25 x 30 cm o con el muestreo de 10 cm de profundidad del suelo. El número de monolitos depende de la superficie del sitio muestreado: diez monolitos distribuidos al azar en las áreas pequeñas como huertos familiares o policultivos de traspatio con el fin de perturbar lo menos posible el cultivo (Huerta, 2007). En las áreas extensas: como las selvas, monocultivos o poli cultivos de gran extensión el número de monolitos se sugiere de 50 en un cuadrante de 18 x 8 m. Los especímenes dependiendo del estudio se pesan, montan e identifican *in situ*, en su caso para la investigación de la flora del sistema digestivo de las lombrices, se llevan al laboratorio para el aislar, purificar e identificar los procariontes (Fragoso, 2001; Hyun-Jung *et al.*, 2004).

Fijación

Para fijar a la lombrices, se limpian con agua estéril para eliminar la tierra que puedan llevar adherida al cuerpo (Figura 3a). Posteriormente se introducen en etanol al 70 %, y en agua destilada-estéril a temperatura de 50 °C por 10 segundos y se disertan inmediatamente (Figura 3b y 3c). Para posteriormente colocarla sobre una superficie plana de modo que quede lo más recto posible (Hyun-Jung *et al.*, 2004).

Cuando se colocan sobre la superficie plana, hay que disponerlos de forma tal que queden lo más recto posibles, pero sin estirar sus extremos porque se modifica la longitud. El tiempo que permanecen sobre la superficie plana debe ser de 5 a 10 minutos. Si los ejemplares se secan, podemos humedecerlos con un pincel con agua estéril. Algunas especies expulsan en el momento de la fijación, a través de sus poros dorsales, líquido procedente de las cavidades celómicas (Moreno, 2009).

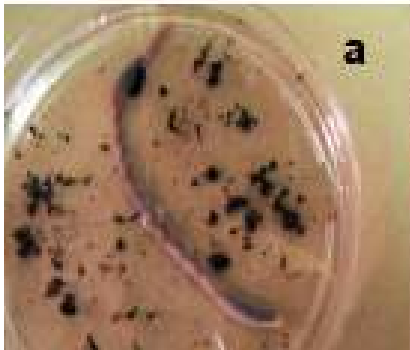
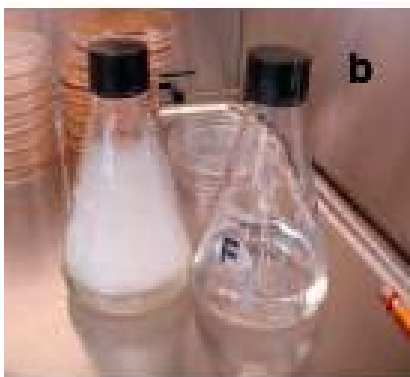


Figura 3.

- a) Lavado de lombriz de tierra
- b) Líquido fijador
- c) fijación de la lombriz.



El sustrato del tracto digestivo del cuerpo de la lombriz

La lombriz de tierra tiene un cuerpo cilíndrico ahusado y segmentado. Presenta diminutas cerdas llamadas sedas. Aunque existen diferencias de tono entre las partes superior e inferior del cuerpo, y entre diferentes partes de éste, las lombrices de tierra son en general de color uniforme, casi siempre rojo pálido, pero que puede variar del rosa mate a castaño. Muchas especies, alcanzan una longitud de pocos centímetros, pero ciertas especies tropicales llegan a medir hasta 3 m de longitud. El aparato digestivo está formado por una faringe musculosa, un delgado esófago, un buche o receptáculo de comida de paredes delgadas, una molleja muscular empleada para moler la tierra ingerida y un intestino largo y recto (Sim y Gerard, 1985).

Del sistema digestivo se toma el sustrato, el cual puede trabajar de la siguiente manera: 1) dividir los segmentos de la lombriz, que puede ser en cuatro partes y las cuales se disecciona con un bisturí estéril, en dirección de la boca al ano, hasta llegar al sustrato (Figura 4), con una asa estéril cada vez que se obtiene el extracto del sistema digestivo y se introduce en un medio liquido de cultivo. Con este procedimiento pueden obtenerse Unidades Formadoras de Colonias (UFC), para analizar la presencia e identificación de diferentes géneros y especies de bacterias u otras líneas de la investigación.

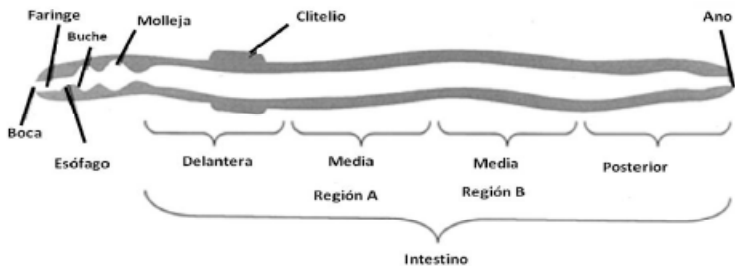


Figura 4. El sistema digestivo de la lombriz de tierra

Aislamiento y purificación de bacterias

Introducción

Las bacterias son microorganismos que presentan un tamaño de algunas micras de largo (0,5 y 5 μm) de diversas formas, como esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariontas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (animales y plantas), no tienen núcleo ni organelos internos bien definidos. Generalmente, poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano, muchas bacterias tienen flagelos o otros sistemas de desplazamiento, para ser móviles (Madigan *et al.*, 2003). Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, crecen en el suelo, manantiales calientes y ácidos, desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la

corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que hay cerca de 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce; en total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Atlas y Bartha, 1998).

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de éstas. Por ejemplo, cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio, por lo que una gran parte, cerca del 90 % de las especies de bacterias existentes, todavía no han sido descritas. Las bacterias para su crecimiento deben tener una fuente de energía y los nutrientes necesarios para el protoplasma. Estos factores de crecimiento o requerimientos para el desarrollo bacteriano están dados por un medio de cultivo adecuado, que depende de cada bacteria; una atmósfera que determina la cantidad de oxígeno requerida, un pH específico para cada medio y una temperatura apropiada de crecimiento (White, 1995; Atlas y Bartha, 1998).

Todo material en el que los microorganismos puedan reproducirse, es un medio de cultivo; estos medios se preparan sobre una sustancia llamada agar que se extrae de algas marinas y que no puede ser digerida por las bacterias, pero que da consistencia suficiente para soportar la adición de sustancias nutritivas y permite el crecimiento bacteriano, a los medios se le pueden agregar nutrientes tales como: peptona (proteína que sirve como fuente de carbono y nitrógeno), extracto de carne que proporciona proteínas y carbohidratos, sueros bovinos, sangre humana, de cordero o de otros animales, vitaminas, minerales y cloruro de sodio (Atlas y Bartha, 1998).

Procedimiento

Las suspensiones de células microbianas se diluyen antes de su siembra en placa. Se diluye 10^9 veces para obtener una suspensión con un centenar de células por ml. Por tanto, se realizan diluciones seriadas (en varias etapas), normalmente de diez en diez, pero a veces de cien en cien (Figura 5). Para realizar diluciones de diez en diez, se añade 1 ml a 9 ml, al primer tubo se le coloca 1g de la muestra aislada del tracto digestivo de la lombriz de tierra, en un tubo que contenga 9 ml de caldo estéril de Brain Heart Infusion (BHI). Posteriormente, se procede a tomar del segundo tubo 1 ml y se realizan las diluciones seriadas a 10^9 . En cada toma de la dilución se debe agitar vigorosamente para diluir las células y el proceso se repite cuantas veces sea necesario. A continuación, se describen los métodos para el tipo de siembra en las placas con el medio de cultivo (Atlas y Bartha, 1998; Hyun-Jung *et al.*, 2004).

- 1) Método de vertido en placa, las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa (Figura 6). Algunas colonias quedarán embebidas en el agar y otras crecerán en la superficie. Las colonias superficiales se extenderán y serán más grandes.
- 2) Método extensión en placa, las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa de Diralsky de cristal estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie.
- 3) El método de siembra por estría en placa utiliza un asa de siembra, se inicia tomando una muestra de la colonia bacteriana y a continuación se realizan las estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una caja Petri.

Conforme se van haciendo estrías en zig zag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos. A continuación, se flamea la asa, se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie del medio sin sembrar aún (Figura 7). En este método de siembra por estría, no se tiene la seguridad de que las colonias que se siembra en las placas por extensión o en el agar solidificado por el método del vertido en placas sean cultivos axénicos y se sugiere repetir el proceso.

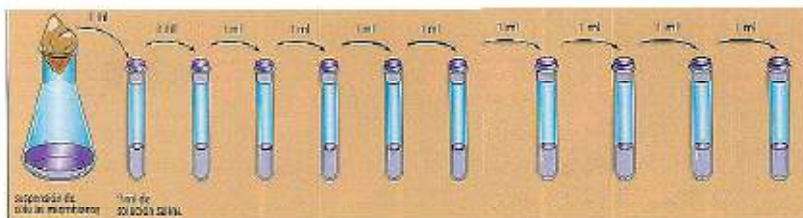


Figura 5. Diluciones seriadas en medio de caldo Brain Heart Infusion o solución salina.

Las técnicas de siembra por dilución presentan la ventaja de que permiten obtener un mayor número de colonias aisladas con respecto al método de siembra por estría, por tanto se eligen cuando se ha de seleccionar una cepa a partir de una mezcla con varios tipos de microorganismos.

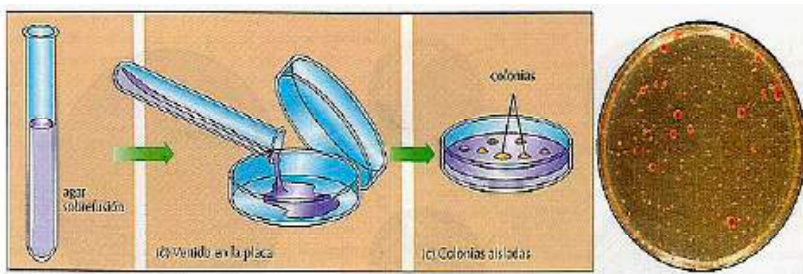


Figura 6. Aislamiento de colonias de bacterias.

A continuación, las placas se incuban en un lugar adecuado, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles. Aunque cada colonia posiblemente representa un clon derivado de una sola célula. Quizás, dos células quedaron depositadas tan juntas que han originado una única colonia mixta. Por tanto, para asegurarnos de que hemos obtenido un cultivo axénico, conviene repetir el procedimiento a partir de una colonia bien aislada en la primera placa. Las colonias que se desarrollen la segunda vez, serán, casi con toda seguridad, cultivos axénicos (Hyun-Jung *et al.*, 2004).

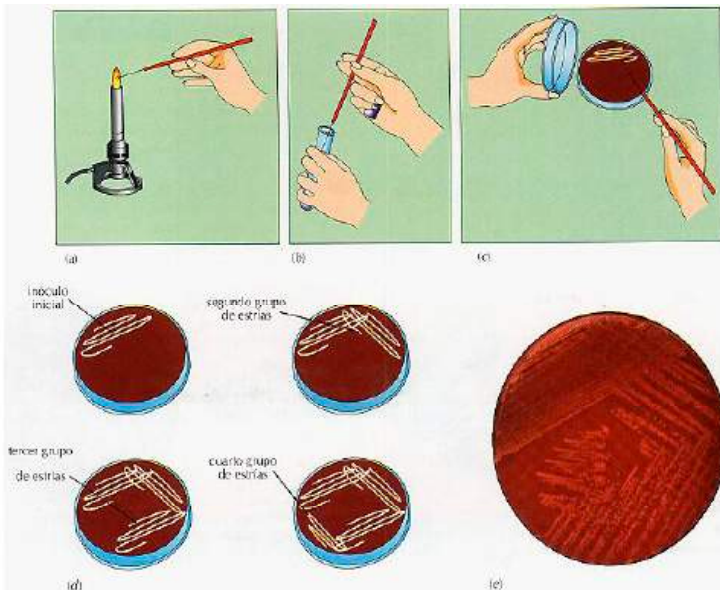


Figura 7. Método de aislamiento por siembra por estría en placa.

En la Figura 7 se observa el método de aislamiento por siembra de estría en placa. Para obtener un cultivo axénico: (a) esterilizar un asa de siembra por flameado en la llama de un mechero, (b) introducirla en la suspensión bacteriana para recoger una muestra, (c) sembrar haciendo estrías sobre la superficie de

un medio sólido en una caja Petri, y (d) volver a esterilizar el asa, tocar la zona de agar y hacer un segundo grupo de estrías en una región nueva en la zona de agar sin estriar. Repetir el proceso una tercera y una cuarta vez, hasta conseguir que los grupos de células se diluyan y se separen células aisladas y (e) después de la incubación de 24 a 48 h a temperatura de 30 °C, se desarrollarán las colonias. Para estar seguro de que el cultivo es puro, repetir el proceso de nuevo; para ello tomar una colonia aislada y sembrar por estrías una segunda caja Petri. Las cepas bacterianas se aislarán y purificarán en su respectivo medio (Figura 8), resemebrando las veces que sea necesario hasta obtener una cepa pura (White, 1995; Hyun-Jung *et al.*, 2004).

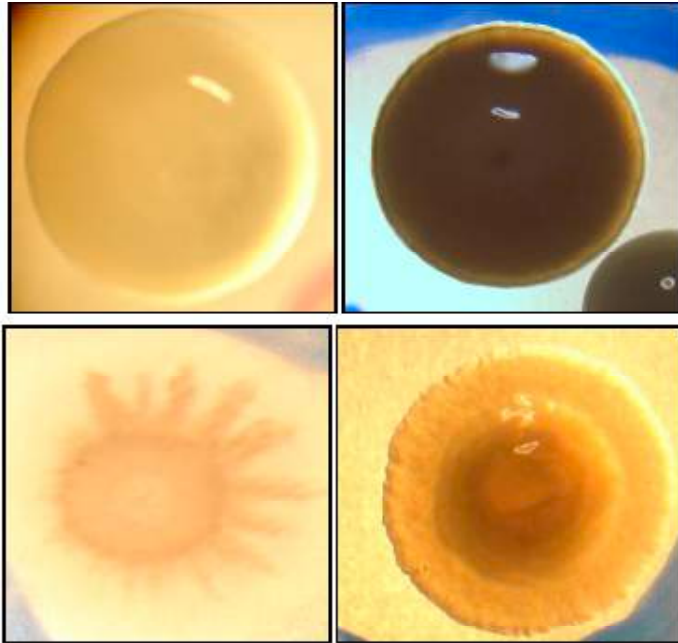


Figura 8. Preparación de las cajas de Petri.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias totales

Para determinar el número de UFC en una muestra procesada por el método de diluciones, se cuenta el número de colonias formadas en las cajas Petris, de preferencia aquellas que tengan entre 30 y 300, se calcula el número de UFC contenidas

en un mililitro de la dilución usada para inocular cada caja Petris y se multiplica por el inverso de la dilución usada. Para el crecimiento y conteo de bacterias se utilizan medios selectivos, agar nutritivo, agar de soya tripticaseína, medio de King, *Pseudomonas*, y agar BHI (Figura 9). Sembrando en las diluciones 10^{-4} a 10^{-9} e incubar de 24 a 48 h a temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (White, 1995; Hyun-Jung *et al.*, 2004).



Figuras 9. Colonias de bacterias aisladas y puras.

Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias

Introducción

Existen diferentes manuales para la clasificación de bacterias, el más utilizado es el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación, que consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas, y la comparación de estas características con los diferentes

taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación. Las pruebas bioquímicas determinan la presencia o ausencia de una enzima o grupo de enzimas, vía metabólica, por medio del crecimiento a temperatura de 28 °C por 24 h. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador o kits comerciales), que puede ser heterogéneo aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos. Por ejemplo, se debe suplir con factores de crecimiento del medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente (MacFaddin, 2004).

Procedimiento

- 1) Obtener un cultivo puro
- 2) Hacer un examen microscópico de las células, la tinción de Gram, la agrupación, flagelos y la presencia de esporas.
- 3) Determinar las características nutricionales; fotoautótrofos, ftoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.
- 4) Realizar las pruebas primarias: catalasa, peroxidasa, oxidasa, citrato, coagulasa, β -galactosidasa, licuefacción de la gelatina, oxidación y fermentación (O/F), fermentación de glucosa, crecimiento en aerobias y anaerobia, movilidad, MacConkey y movilidad.
- 5) Realizar las pruebas secundarias y terciarias a efecto de llegar a la especie. Estas dependerán del género o familia determinado: producción de pigmentos, indol a partir de triptofano, coagulasa, de fenilamina desaminasa, hidrólisis del almidón, hidrólisis de la

caseína, β -lactamasa, lipasa, ureasa, fosfatasa, porfirina-ácido δ -aminolevulínico (ALA), hidrólisis de pirrolidoni- β -naftilamina (PYR), sensibilidad a la lisostafina, fermentación de hidratos de carbono, ácido sulfhídrico y reducción de nitratos.

Morfología de la colonia

- 1) Observar los microorganismos teñidos en el microscopio.
- 2) Describir la forma y tamaño de la bacteria

Tinción de Gram

Se realizan frotis de diferentes bacterias, tomando una colonia del medio con mayor desarrollo. Se procede a realizar la tinción de Gram (Figura 10) y se observa bajo el microscopio. Con esta prueba se determina el tamaño y la forma de las células bacterianas (Figura 11).

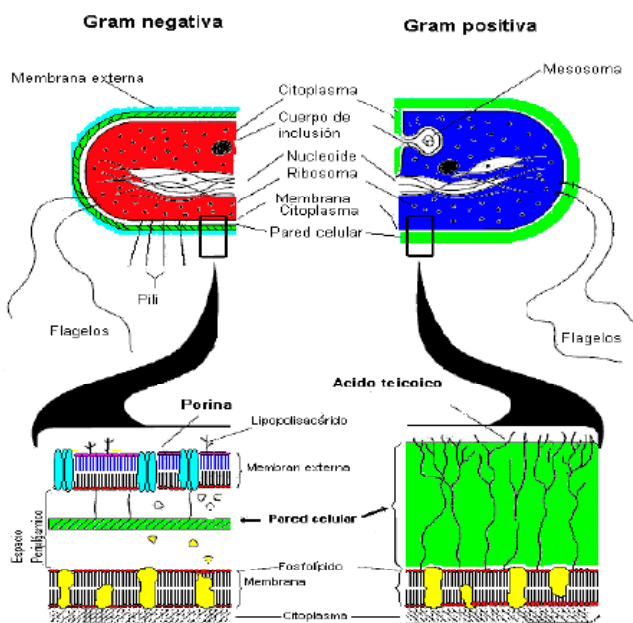


Figura 10. Diferencia de la pared bacteriana por la tinción de Gram positivo y negativo.

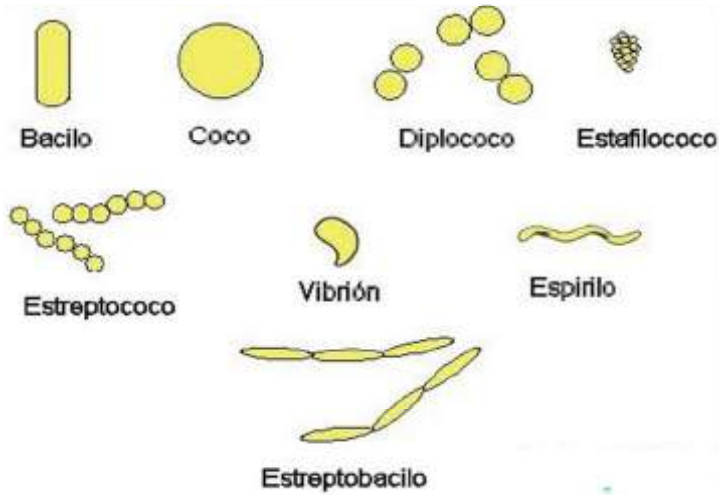


Figura 11. Forma de las células bacterianas.

La tinción de Gram (Figura 12) se realiza de la siguiente forma:

- 1) Preparación del frotis: Se flamea la punta del asa, se deja enfriar y se procede a tomar una colonia bacteriana.
- 2) La muestra bacteriana se coloca sobre un portaobjetos limpio y se extiende sobre el mismo con el asa; se flamea el asa y se deja secar al aire el portaobjetos.
- 3) Se fija en el portaobjetos exponiendo este último a la flama del mechero por unos segundos.
- 4) Se añaden unas gotas de solución de cristal violeta y se deja 1 minuto. Pasado éste tiempo, el portaobjetos se coloca al chorro de agua para eliminar el exceso de cristal violeta.
- 5) Se adicionan unas gotas de solución de lugol y se deja por 2 minutos. Se enjuaga el exceso.
- 6) Se decolora con unas gotas de solución alcohol-cetona. Se enjuaga el exceso.
- 7) Se agregan unas gotas de solución de safranina por 2 minutos.

- 8) Se colocará el portaobjetos al chorro de agua para retirar el exceso de safranina y se deja secar.
- 9) Se observará bajo el microscopio óptico empleando el objetivo de inmersión de 100X. Se anotan las características que se observa en el microscopio.

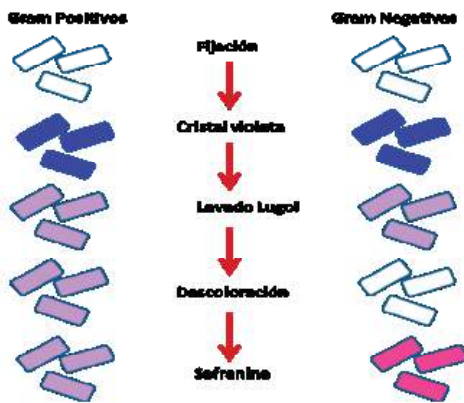


Figura 12. Procedimiento para tinción de Gram positivas y negativas

Pruebas bioquímicas

Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer se transforma o no. Se realizan pruebas bioquímicas tomando una colonia bacteriana y se inocula en medios de cultivo (Castillo y Bruckner, 1984). La preparación se hace siguiendo las especificaciones descritas en la etiqueta de cada uno.

- 1) Enzimas vinculadas con la respiración
 - 1.1) Oxidasa
 - 1.2) Catalasa

- 2) Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros
 - 2.1) Requerimientos de oxígeno
 - 2.1.1) OF (óxido-fermentación)
 - 2.1.2) Crecimiento en caldo tioglicolato
 - 2.2) Producción de ácido, o ácido y gas
 - 2.2.1) Fermentación de carbohidratos
 - 2.3) Detección de enzimas y vías metabólicas
 - 2.3.1) RM-VP (rojo de metilo- Voges Proskauer)
 - 2.3.2) Gluconato
 - 2.3.3) O.N.P.G. (orto nitro β-D-galactopiranosico)
 - 2.3.4) Esculina
 - 2.3.5) Hipurato

- 3) Fuente única de carbono
 - 3.1) Citrato
 - 3.2) Malonato
 - 3.3) Hipurato para coliformes

- 4) Utilización de compuestos nitrogenados
 - 4.1) Reducción de nitrato
 - 4.1.1) Asimilación
 - 4.1.2) Denitrificación
 - 4.2) Descomposición de carbohidratos aminoácidos y otros
 - 4.2.1) Índole
 - 4.2.2) H₂S
 - 4.2.3) Fenilalanina
 - 4.2.4) Lisina, arginina, ornitina
 - 4.2.5) Urea

5) Ensayos combinados

5.1) TSI (Triple Azúcar Hierro)

5.2) LIA (Agar Hierro Lisina)

5.3) Bilis esculina

6) Detección de exoenzimas

6.1) Lecitinasa

6.2) Proteasas, coagulasa

6.3) Amilasas

6.4) Celulasas

6.5) Desoxirribonucleasas

6.6) Acción de microorganismos sobre la sangre
(hemolisinas)

7) Misceláneos

7.1) KCN

7.2) Bilis

7.3) Producción de pigmentos

8) Test de crecimiento o inhibición

8.1) Temperatura

8.2) NaCl

8.3) Antibióticos

Ensayos bioquímicos o kits

Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos bioquímicos, los cuales proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación taxonómica de una bacteria, facilitan la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, proveen los reactivos listos para su uso o son totalmente automatizados. Los kits comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya

sea sustratos deshidratados, tiras de papel de filtro impregnadas en reactivos o pequeños compartimentos con medios listos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados. Los sistemas comerciales más usados son los siguientes:

BBL, Enterotube II (Becton Dickinson): Es un sistema para usar en la identificación de enterobacterias, definida como bacillus gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa negativa. Consiste en un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente en una etapa y permiten la detección de 15 características bioquímicas.

OXI/FERM Tube II (Becton Dickinson): Es un sistema listo para usar para la identificación de bacillus gram negativas, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa positiva. Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas.

API: Es un sistema estandarizado para la identificación de bacterias bacilos (API CHB), lactobacilos (API CHBL) con 50 pruebas, no enterobacterias (API NE), enterobacterias (API E), y anaerobias (API A), API 20 C (Para levaduras del género *Candida*) con 20 pruebas, respectivamente, para bacterias Gram negativas y positivas. Consiste en una galería con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de 20 hasta 50 pruebas bioquímicas a partir de una colonia bacteriana.

Sistema API®

Introducción

API es un sistema estandarizado que permite la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos, el cual, consiste en una galería con cúpulas que contienen medios de cultivo deshidratados, que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana (Cuadro 1). Permite la realización de pruebas bioquímicas a partir de una única colonia bacteriana en un periodo de 24 a 48 h. Inocular el microorganismo en el sustrato químico para inducir el metabolismo y demostrar la actividad enzimática (MacFaddin, 2004). Siempre que se prepara una misma colonia bacteriana para una galería API®, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para ese test.

Procedimiento

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (12-24 h de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura adecuados. Siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para ese test (MacFaddin, 2004).

Preparación de la galería

- 1) En la galería de incubación repartir 5 ml de agua estéril en los alveólos para crear una cámara húmeda.
- 2) Abrir una ampolleta de API médium o en su caso preparar tubos NaCl 0.85 % (2 ml).

- 3) Con una pipeta o PSIpette, tomar de 1 a 4 colonias de la placa de agar y realizar la suspensión bacteriana en API médium con una turbidez igual a 0.5 de McFarland.
- 4) Inocular con la suspensión bacteriana por medio de pipeta y puntillas estéril (100-200 μm) las cúpulas de la galería API E, API NE y API CHB (Figura 13, 14 y 15).
- 5) Incubar en una cámara húmeda a 29 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.
- 6) Anotar en la hoja de los resultados de las galerías en algunos casos se aplican reactivos de bioMérieux® SA para revelar reacciones como NO_3 (NIT 1, NIT 2 Y Zn), TPR (James), VP (VP1 + VP2), TDA (TDA), oxidasa y API M médium o microscopio (movilidad), API OF médium (oxidación y fermentación), medio MacConkey.
- 7) Los resultados se introducen al software de *apiweb*™ para conocer el género y especie de la bacteria.

Cuadro 1. Tests de las reacciones o actividades enzimáticas de la bacteria de las galerías API[®]NE20 y E20 BioMérieux[®].

| TESTS | COMPONENTES ACTIVOS API [®] NE 20 | REACCIONES/ENZIMAS | TESTS | COMPONENTES ACTIVOS API [®] E 20 | REACCIONES/ENZIMAS |
|-----------------|---|--|------------------|--|--|
| NO ₂ | Nitrato Reducción | Reducción de nitratos en nitratos | ONPG | 2-nitro-formil-βD-galactopiranosida | β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosida) |
| TPT | L-triptófano | Reducción de nitratos en nitrogeno | ADH | L-arginina | Arginasa-actividad reductasa |
| GELU | D-glucosa | Fermentación de lactato [Triptófano] | LDC | L-lisina | Lisina Descarboxilasa |
| ADH | L-arginina | Fermentación (Glucosa) | ODC | L-serina | Ornithina Descarboxilasa |
| URE | Ureasa | Arginasa DNitratasa | CIT | Glutarato triacético | Utilización de citrato |
| ESC | Esoulina Glutarato (Férreo) | Ureasa | H ₂ S | Tiosulfato sólido | Producción H ₂ S |
| GEL | Gelatina (origen bovino) | Hidrólisis [β-galactosidasa] (Esoulina) | URE | ureasa | Ureasa |
| PMPC | 4-nitrofenil-βD-galactopiranosida | Hidrólisis [proteasa] (gelatina) | TBA | L-triptófano | Triptófano Descarboxasa |
| GELU | D-glucosa | β-galactosidasa (Para-Nitrofenil-βD-Galactopiranosida) | RND | L-triptófano | Producción de Indole |
| ABA | L-arabinosa | Asimilación Glucosa | VP | Fructosa sólido | Producción de acetoina [Negativo] |
| MINE | D-erucosa | Asimilación Arabinosa | GEL | Gelatina (origen bovino) | Proteolisis [Gelatina] |
| MAN | D-manitol | Asimilación Maltosa | GELU | D-glucosa | Fermentación/oxidación (Glucosa) |
| MAE | N-acetil-glucosamina | Asimilación Mannitol | MAN | D-manitol | Fermentación/oxidación (Mannitol) |
| MAL | D-maltosa | Asimilación N-Acetil-Glucosamina | RND | Indoxil | Fermentación/oxidación (Indoxil) |
| GNT | glucuronato picúico | Asimilación Maltosa | SDR | D-sorbitol | Fermentación/oxidación (Sorbitol) |
| DAP | Ácido capríco | Asimilación Glucuronato picúico | BHA | L-risina reosa | Fermentación/oxidación [Risina reosa] |
| AII | Ácido iúfírico | Asimilación Ácido capríco | SAC | D-sacarosa | Fermentación/oxidación [Sacarosa] |
| MILT | Ácido málico | Asimilación Ácido iúfírico | MEL | D-melibiosa | Fermentación/oxidación [Melibiosa] |
| CT | citrato triacético | Asimilación Maltosa | AMY | Amilopéctina | Fermentación/oxidación [Amilopéctina] |
| PAC | Ácido ferulónico | Asimilación citrato triacético | ABA | L-arabinosa | Fermentación/oxidación [Arabinosa] |
| DI | ————— | Asimilación ácido ferulónico | OR | ————— | Glucuronato-oxidasa |



Figura 13. Galería de Api 20 E pruebas negativas y positivas.

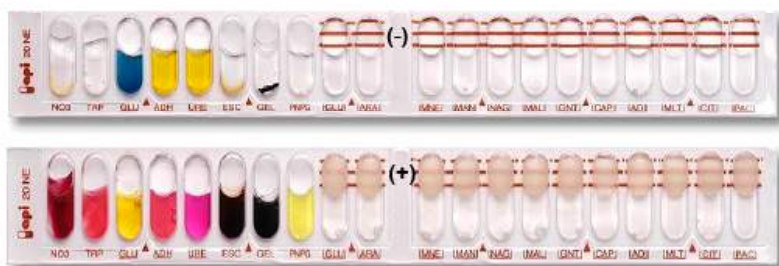


Figura 14. Galería de Api 20 NE pruebas negativas y positivas.

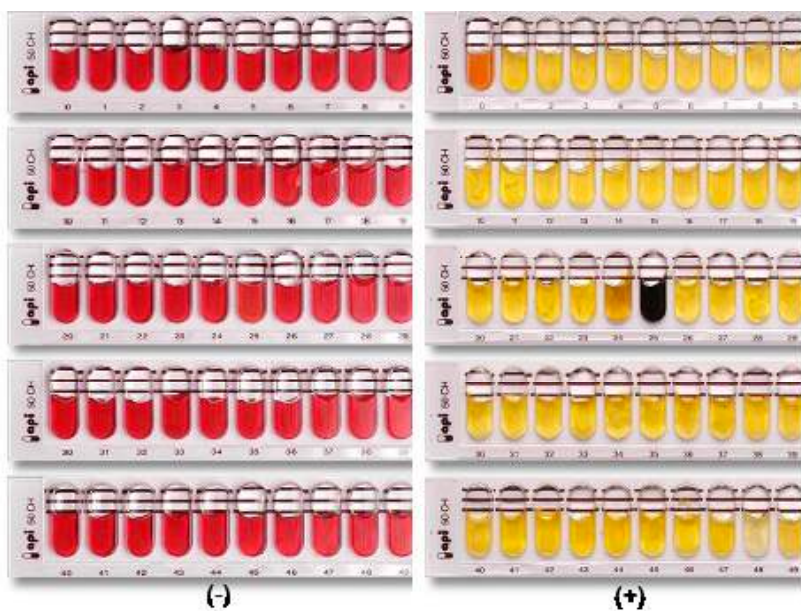


Figura 15. Galería de Api 50 CH pruebas negativas y positivas.

Amplificación del gen 16S ARNr en procariontes

Introducción

A la biología molecular le concierne principalmente el entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye relaciones, entre el ADN (ácido desoxirribonucleico), el ARN (ácido ribonucleico), la síntesis de proteínas y el metabolismo. Aunque algunos organismos del mismo género y especie comparten las mismas características generales, existen variaciones bioquímicas y genéticas. Todas las células vivas procariontes y eucarióticas, poseen contenidos de información que reside en la secuencia lineal de bases del ADN. En el caso de las bacterias, el ADN es a menudo una sola molécula de doble banda cuyos extremos se unen entre sí para formar un círculo, de carga negativa forma un complejo con proteínas y de carga positiva que le permiten condensarse en una estructura compacta denominada cromosoma bacteriano (Balbás, 2002). La secuencia lineal de bases del ADN que codifica a los aminoácidos de un polipéptido particular se denomina gen (Snyder y Champness, 1997). Una célula se divide para dar origen a dos células hijas idénticas, la información genética de la célula progenitora debe duplicarse fielmente de modo que cada célula hija reciba su propia copia de la información genética. En todos los organismos existen requerimientos generales para la síntesis de ADN: un template molde, que es el ADN original que va a copiarse; una secuencia iniciadora (*primer*) que hibride para que se formen puentes de hidrógeno con el template y provea un extremo libre 3'OH para que la enzima ADN polimerasa pueda comenzar la síntesis de la cadena nucleotídica; el ión Mg^{+2} , los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs); la ADN polimerasa que es la enzima catalizadora de las uniones fosfodiéster entre los dNTPs; y otras proteínas y enzimas auxiliares del proceso. Los ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARNr) son transcritos como una sola

molécula de gran tamaño (pre-ARNr), que posteriormente se procesa y modifica para producir las dos subunidades de ARNr. En procariontes, la secuencia que codifica para ARNr 5S es parte de la misma unidad transcripcional de los ARNr 23S y 16S. Para estudiar la diversidad bacteriana, las técnicas del ADN recombinante permiten superar las limitaciones de no poder cultivar la mayoría de las bacterias de un ambiente particular (Escalante *et al.*, 2004). El análisis de las secuencias de los genes que codifican los ARN ribosomales 16S ha permitido establecer huellas moleculares a varios niveles taxonómicos, utilizados como la base de una identificación bacteriana por comparación filogenética (Theron y Cloete, 2000).

Procedimiento

Amplificación del gen16S ADNr

La amplificación de la región 16S ADNr se maneja a 2,5 U de enzima taq polimerasa suministrada por promega®, y el kit acompañante (buffer 5 µl (X10) y 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM), así como 1µl de la mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5 µM de cada *primers* (Cuadro 2), y 5 µl de ADN bacteriano hasta conseguir un volumen final de reacción de 25 µl (Vickerman *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Primers universales para amplificar el ADN bacteriano

| Primers universales | Autor |
|---|--------------------------------|
| 240-derecho (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3') | Widmer <i>et al.</i> (1998) |
| 520-derecho (5'-GATACCCTGGTAGTCCACG-3') | |
| 800-derecho (5'-GTGCTGCATGGCTGTCGTC-3') | |
| 280-izquierdo (5'-GCTTTACGCCAGTAATTC-3') | |
| 520-izquierdo (5'-CGTGGACTACCAGGGTATC-3') | |
| 800-izquierdo (5'-GACGACAGCCATGCAGCAC-3') | |
| GM3 (S-D-Bacteria-8-b-S-16) | Davidson y Stahl (2006) |
| GM4 (S*-Univ-1492-b-A-16) | |
| 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') | Vickerman <i>et al.</i> (2007) |
| 1391R (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3') | |
| 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') | |

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplifica la región del gen 16S ribosomal del ADN de las cepas bacterianas, con la mezcla preparada se incuba en un termociclador. El programa de amplificación comprende un ciclo de predesnaturalización a 94 °C, por 3 min, 35 ciclos de amplificación que consisten en desnaturalización a 94 °C, por 1 min; alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min y un último ciclo de elongación final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación serán visualizados en geles de agarosa.

Se utiliza concentraciones de agarosa entre 0.5 a 2 %, según el tamaño de los fragmentos a separar (Maniatis *et al.*, 2012). La agarosa se gelidifica en tampón TAE1X (Tris 242 g/l, EDTA 0.05 M pH 8, ácido acético glacial 57.1 ml/l). Para visualizar el ADN, se añade bromuro de etidio (agente intercalante) al gel, a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se mezclan, en una proporción 1/5 del volumen total, con tampón de muestras X6 (sacarosa 40 %, azul de bromofenol 0.25 %). La electroforesis se realiza en cubetas horizontales aplicando un voltaje de 5-10 V/cm (Widmer *et al.*, 1998). Los geles se observan y/o fotografían en un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm) empleando un fotodocumentador.

Anexo

Líquido de recuperación:

| | |
|---|---------|
| Sulfato de cobre anhidro (CuSO_4)..... | 38.5 ml |
| Ácido acético glacial..... | 38.5 ml |
| Formol..... | 38.5 ml |

Aforar a 500 ml de agua destilada

Líquido conservante:

Formalina al 4 %

Medios de cultivo selectivos

AGAR NUTRITIVO

| Fórmula | gramos por litro |
|-------------------|-------------------------|
| Pluiopeptona | 5.0 |
| Extracto de carne | 3.0 |
| Cloruro de sodio | 8.0 |
| Agar | 15.0 |

Instrucción

Suspender 31 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.3 ±0.2

Caldo soya tripticaseína con 0.6 %
de extracto de levadura (CSTEL)

| Fórmula | gramos por litro |
|--------------------------|-------------------------|
| Caldo soya tripticaseína | 30 |
| Extracto de levadura | 6 |

Procedimiento

Suspender 31 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.3 ± 0.2

Agar soya tripticaseína

AGAR SOYA TRIPTICASEÍNA

| Fórmula | gramos por litro |
|---------------------|-------------------------|
| Peplona de Caseína | 15 |
| Peplona de Soya | 5 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Agar Bacteriológico | 15 |

Procedimiento

Suspender 20 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución y esterilizar a 12 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

pH final: 7.3 ±0.2

Medio B de King (*Pseudomonas fluorescense*)

MEDIO B DE KING (*Pseudomonas fluorescense*)

| Fórmula | gramos por litro |
|---|-------------------------|
| Peptona proteosa | 20 |
| Glicerol | 10 0 15 ml |
| K ₂ HPO ₄ (anhídrico) | 1.5 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 1.5 |
| Agar | 15 |

Procedimiento

Suspender 20 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución y esterilizar a 12 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

pH final: 7.3 ±0.2

Caldo infusión de cerebro y corazón (o Brain Heart Infusion, BHI)

| Fórmula | gramos por litro |
|--------------------------------|-------------------------|
| Infusión de Cerebro de Ternera | 200 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Infusión de Corazón de Res | 5 |
| Fosfato disódico | 2.5 |
| Dextrosa | 2 |
| Peptona de Gelatina | 10 |

Procedimiento

Suspender 37 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución y esterilizar a 12 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

pH final: 7.3 ±0.2

Medios para la prueba de movilidad (MIO)

| Fórmula | gramos por litro |
|----------------------------|-------------------------|
| Peptona de caseína | 20 |
| Peptona de carne | 6.1 |
| Sulfato de hierro y amonio | 0.2 |
| Tiosulfato de sodio | 0.2 |
| Agar | 3.5 |

Procedimiento

Suspender 20 g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución y esterilizar a 12 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

pH final: 7.3 ±0.2

Pseudomonas agar

| Fórmula | gramos por litro |
|---------------------|-------------------------|
| Peptona de gelatina | 20 |
| Sulfato de potasio | 10 |
| Cloruro de magnesio | 1.4 |
| Agar | 15 |

Procedimiento

Suspender 46,4 g del polvo en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerina. Calentar con agitación constante para homogeneizar el producto. Llevar a ebullición para que se disuelva por completo. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 121 °C

pH final: 7.3 ±0.2

Reactivos para tinción de Gram

Etanol (95%) 700 ml
Acetona 300 ml
Mezclar ambos líquidos.

Solución de Safranina

Safranina 0,25 g
Etanol (95%) 10 ml
Agua 100 ml

Solución de Yodo

Yodo 1 g
Yoduro de potasio 2 g
Agua 300 ml

Cristal violeta

Solución A

Cristal violeta 2 g
Etanol (95%) 20 ml
Disolver el cristal violeta en el etanol.

Solución B

Oxalato de amonio 0,8 g
Agua 80,0 ml

Procedimiento Solución A y B

1. Disolver el oxalato de amonio en el agua
2. Mezclar las soluciones A y B

Sobre los autores



Hortensia Brito Vega. Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola-pecuario por la Universidad Autónoma del Estado de México; Maestra en Ciencias en Edafología, Área de Microbiología, por el Colegio de Postgraduados; Doctora en Ciencias en Especialidades Agrícolas por el Colegio de Postgraduados. Profesora-Investigadora de tiempo completo de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Miembro del Sistema Estatal de Investigadores del Estado de Tabasco. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Líneas de investigación: Población de la biota del Suelo y bioinoculantes, simbiosis entre los microorganismos-plantas, Diversidad Genética de Microorganismos. Ha publicado recientemente en *Terra Latinoamericana*, *Journal of Environmental Quality and Management* y *Journal of Biological Sciences*.



David Espinosa-Victoria. Biólogo por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (1986); Maestro en Ciencias en el Colegio de Postgraduados (1989); Doctor en Filosofía (PhD) por el Soil, Water and Climate Department de la University of Minnesota (1997). Sus líneas de investigación son: Ecología microbiana, interacción molecular planta-microorganismo, diversidad genética de microorganismos, interacciones hongo-raíz, macrofauna del suelo y biofertilizantes. Imparte 3 cursos a nivel de postgrado en el Colegio de Postgraduados: Interacción molecular planta-microorganismo, Filosofía de la ciencia (Clave EDA- 646) y Seminario de investigación II. Actualmente es presidente de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, SMCS (2012-2013). Ha graduado 6 estudiantes de doctorado, 15 de maestría y 4 de licenciatura. Ha publicado más de treinta artículos científicos en revistas especializadas, nacionales e internacionales, como: *American Journal of Potatoe Research*, *Crops Science*, *Genetic Resources and Crop Evolution*, *Acta Physiologiae Plantarum*, *Science of the Total Environment*, *Soil, Biology and Fertility*, *Interciencia*, *Agrociencia*, *Terra Latinoamericana*, *Fitotecnia Mexicana* y *Journal of Biological Sciences*. Igualmente ha publicado un libro y cinco capítulos de libro. Por su trayectoria científica y académica pertenece al Sistema Nacional de Investigadores (SNI).



Armando Gómez Vázquez. Ingeniero Zootecnista, por la Universidad Autónoma de Chapingo; Maestro en Ciencias en Ganadería por el Colegio de Postgraduados; Doctor en Ciencias en Ganadería por el Colegio de Postgraduados con estancia doctoral en la Universidad de Québec Canadá; Posdoctorado en Ganadería y Ambiente por el Colegio de la Frontera Sur. Ha sido profesor colaborador de las Universidades: de Chapingo, UNAM, UAM, UAEM y el Colegio de Postgraduados. Profesor-investigador de tiempo completo 2000-2002 en la Universidad del Mar. Profesor-Investigador de tiempo completo de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Perfil PROMEP desde el año 2005 a la fecha. Miembro del Sistema Estatal de Investigadores del Estado de Tabasco, desde el año 2004 a la fecha. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde el año 2004 a la fecha.



Isabelle Barois. Bióloga por la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I); Doctora en Ecología General por la Universidad Paris VI, Pierre et Marie Curie, Francia. Adscrita al Instituto de Ecología, A. C. Investiga las lombrices de tierra, en particular, sus Interacciones con los microorganismos para la digestión de la materia orgánica; hace inventarios de macrofauna en diferentes usos de suelo y desarrolla el lombricompostaje. Ha publicado más de 50 artículos y capítulos. Ha participado en congresos y reuniones internacionales. Miembro del SNI de 1998 al 2011. Coordinó para México el proyecto internacional Conservación y Manejo Sostenible de Biodiversidad en el Suelo (BGBD) ejecutado por TSBF-CIAT, implementado por PNUMA y financiado por GEF de 2002 a 2010.

Referencias

- Anderson JM, Ingram JSI (1993). Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. 2a. edición. CAB International, Oxon. Gran Bretaña, pp 221.
- Atlas RM, Bartha R (1998). Microbial Ecology. Fundamentals and applications. Editorial Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, USA, pp 563.
- Balbás P (2002). De la biología molecular a la biotecnología. Trillas. México, pp 23.
- Belsley DA (2000). A small-sample correction for testing for joint serial correlation with artificial regressions. *Computational Economics*. 16: 5-45.
- Blanchart E, Lavelle P, Braudeau E, Bissonnais LY, Valentin C (1997). Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Côte d'Ivoire. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 431-439.
- Bonilla RG, Souza V, Eguiarte LE (2008). Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 11(1): 41-51.
- Brito-Vega H, Espinosa-Victoria D (2009). Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms (oligochaeta). *Journal of Biological Sciences*. 9(3): 192-199.
- Castillo CB, Bruckner DA (1984). Comparative evaluation of the Eiken and API 20E system and conventional methods for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *Journal Clínica Microbiology*. 20(4): 754-757.
- Chacko M, Yageen PT (2008). Estimation of a parameter of morgenstern type bivariate exponential distribution by ranked set sampling. *American Society of Microbiology*. 60: 301-318.
- Davidson SK, Stahl DA (2006). Transmission of nephridial Bacteria of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (1): 769-775.

- Escalante AL, Gosset-Lagarda G, Martínez-Jiménez A, Bolívar-Zapata F (2004). Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38(6): 583-592.
- Fragoso C (2001). Las lombrices de tierra de México (Annelida, Oligochaeta): Diversidad, ecología y manejo. *Acta Zoológica Mexicana*. Número especial 1: 131-171.
- Freedman D, Pisani R, Purves R (1978). *Statistics*. Toronto. USA, pp 506.
- Furlong MA, Singleton DR, Coleman DC, Whitman WB (2002). Molecular and culture-based analysis of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and environmental microbiology*. 20: 1265-1279.
- Grasso D (2006). Metagenómica: un viaje a las estrellas. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 189.
- Huerta ED, Nuncio De la O-De G (2007). Incremento de la fertilidad del suelo mediante el uso de lombrices de tierra (Glossoscolecidae y Acanthodrilidae) y leguminosas. *Ciencia ergo sum*. 14(2): 172-176.
- Hyun-Jung K, Kwang-Hee S, Chang-Jun Ch, Hor-Gil H (2004). Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 47(3): 137-142.
- Infante GS, Zarate De L GP (1991). *Métodos estadísticos: Un enfoque interdisciplinario*. 2a. edición. Editorial Trillas, México, D.F., pp 643.
- 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 E, Lattaud C, Trigo D, Barois I (1995). Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil*. 170: 23-33.

- MacFaddin JF (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a. edición. Médica Panamericana, México, pp 850.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003). Brock biology of microorganisms. Pearson education Inc., New Jersey, USA, pp 824.
- Maniatis, T., Fritsch EF, Sambrook, J (2012). Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory). University, Texas, USA, pp 2028.
- Moreno GA (2009). Métodos de fijación, conservación y recuperación de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta). En línea; <http://www.ucm.es/info/tropico/investigacion/grupodetaxonomia/preparacion.pdf> (consultada el 26/Abril/2010).
- Sim RW, Gerard BM (1985). Earthworms. The Linnean Society of London and the esturine and brackish-water. Sciences Association, London, pp 368.
- Snyder L, Champnes W (1997). Molecular genetics of bacteria. American Society of Microbiology. Washington, DC, USA, pp 566.
- Theron J, Cloete TE (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*. 26: 37-57.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 782-87.
- Urquhart NS (2007). Introduction to this special issue on the application of spatial statistics to agriculture, ecology, and the environment. *Environmental and Ecological Statistics*. 14: 1-3.
- Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR (2007). Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 110–118.

- White D (1995). The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press, Oxford, USA, pp 628.
- Widmer F, Seidler RJ, Patrick M, Gillevet M, Lidia S, Watrud GD, Giovanni DI (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology. 64(7): 2545-2553.

Esta obra se terminó de imprimir el 14 de diciembre de 2012, con un tiraje de 1000 ejemplares. Impreso en los Talleres de Ideo Gráficos, S. A. de C. V., Calle Juan Álvarez 505, Colonia Centro, Villahermosa, Tabasco, México. El cuidado estuvo a cargo de los autores y del Consejo Editorial de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la UJAT.