

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA PARED
INTESTINAL DE *Onychochaeta borincana*
(Oligochaeta: Glossoscolecidae)**

Por

Roger Humberto Valle Molinares

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS
en
BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVESITARIO DE MAYAGÜEZ
2006

Aprobado por:

Vivian Navas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Ríos Velázquez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Sonia Borges, Ph.D.
Presidenta, Comité graduado

Fecha

Lucy William, Ph.D.
Directora del Departamento

Fecha

José A. Mari Mutt, Ph.D.
Director de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

The intestinal symbiotic relationship between microorganisms and invertebrates is well known. In the case of soil arthropods, the relationship is widely studied, but in earthworms this relation has been only suggested. An intestinal endosymbiosis between *Onychochaeta borincana* Borges 1994 and a microorganism has been proposed but it has not been proven. Scanning Electron Microscopy (SEM), physiological (BIOLOG) and molecular biology (polymerase chain reaction “PCR” of 16S rDNA and fluorescence *in situ* hybridization FISH) techniques were employed to identify and characterize the bacterial flora associated with the intestinal wall of *O. borincana*, in order to determine the possibility of a symbiotic relationship between bacteria and the earthworm, which may affect the worm’s digestive processes.

Two cleansing methods were used (moderate and intense), and evaluated to determine which are eliminated most of the microorganisms belonging to the transitory flora. The intense method was the most efficient. Amplification of bacterial 16S rDNA from the total genomic ADN of the gut was not possible. FISH trials showed no bacteria associated with the intestinal wall of *O. borincana* after intense cleaning, maybe because this cleansing procedure left none or too little an amount of these microorganisms. However, microbiological test show that four endospore-forming and β -hemolytic bacillar strains remained associated to the intestinal wall of *O. borincana* even after intense cleaning. They are physiologically similar to *Bacillus cereus*, a gram-positive bacterium that has been reported as an intestinal symbiont in some edaphic arthropods. These results were

corroborated by SEM that showed bacillar structures similar to streptobacillus adhered to the intestinal wall. Nonetheless, the relationship between *Onychochaeta borincana* and *Bacillus cereus* remains to be defined by further research which may determine a symbiotic relationship among these organisms.

RESUMEN

Las relaciones simbióticas entre microorganismos e invertebrados son bien conocidas. En el caso de los artrópodos del suelo, estas relaciones han sido ampliamente estudiadas, sin embargo para los oligoquetos terrestres esta relación sólo ha sido sugerida. La endosimbiosis intestinal entre *Onychochaeta borincana* Borges 1994 y un microorganismo ha sido propuesta pero no probada. En este estudio se usaron pruebas de microscopía electrónica de rastreo (MER), fisiología (BIOLOG) y biología molecular (reacción de polimerización en cadena “PCR” del 16S ADNr e hibridación *in situ* por fluorescencia “FISH”) para identificar y caracterizar la flora bacteriana asociada a la pared intestinal de *O. borincana*, y determinar la posible existencia de una relación simbiótica entre una bacteria y la lombriz, que afecte de alguna manera los procesos digestivos del verme.

Se evaluaron dos métodos de limpieza (moderado e intenso), para encontrar cuál permitía eliminar la mayor cantidad de microorganismos que formaran parte de la flora transitoria, siendo el lavado intenso el más eficiente. La amplificación del 16S ADNr del ADN genómico total del intestino no fue posible y las pruebas de FISH no mostraron bacterias asociadas a la pared intestinal de *O. borincana* luego de un lavado intenso posiblemente porque este método de limpieza disminuye o elimina la cantidad de microorganismos adheridos al intestino del verme. No obstante, los resultados de las pruebas microbiológicas demuestran que cuatro cepas bacterianas de morfología bacilar, β -hemolíticas y productoras de endosporas permanecen asociadas al intestino de *O. borincana* después del lavado intenso. Las mismas son semejantes fisiológicamente a *Bacillus cereus*,

una bacteria gram-positiva que ha sido reportada como simbionte intestinal de algunos artrópodos del suelo. Los resultados se corroboraron por microscopía electrónica de rastreo, la cual mostró estructuras bacilares semejantes a estreptobacilos adheridas a la pared intestinal. Sin embargo, la relación entre *Onychochaeta borincana* y *Bacillus cereus* aún queda por definirse mediante una investigación que estudie la posible relación simbiótica entre estos organismos.

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas e instituciones que directa o indirectamente me han dado su apoyo para el desarrollo de esta investigación, sin ellos hubiese sido imposible alcanzar las metas trazadas en este estudio.

Gracias a Dios por la fuerza y la ayuda recibida en el momento justo. Gracias a mis padres por su esfuerzo y dedicación en mi formación como persona y por enseñarme lo que ninguna escuela me hubiese podido enseñar. Gracias a mis hermanos por su apoyo incondicional y sus oraciones que Dios siempre escuchó.

Quiero dar gracias a mi esposa por estar conmigo en buenas y malas, pero sobre todo gracias por los hijos que me ha dado que son la luz de mis ojos. Gracias a mi primogénito “Juanca” por recordarme que la vida y el futuro se hacen a base de sacrificios.

Gracias a la doctora Sonia Borges por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría bajo su tutela, gracias a la doctora Mónica Alfaro por toda la ayuda brindada. A mis compañeros de laboratorio, Milena y Andrés, gracias por su ayuda y colaboración.

Gracias al doctor Carlos Ríos Velázquez por su asesoría en cada uno de los experimentos de este trabajo y por el invaluable apoyo logístico. A los compañeros del laboratorio de biotecnología microbiana (graduados y subgraduados), gracias por aceptarme como parte del equipo y hacerme sentir en familia.

Agradezco al programa RETO-PROMISE su colaboración en la adquisición de reactivos y al la Dra. Lilliam Casillas de la UPR-Humacao y al Departamento de la Defensa de los Estados Unidos por facilitarme los reactivos y el equipo para las pruebas de BIOLOG.

Por último y no menos importante quiero dar gracias a los compañeros Iris, Juan, Jeymie y Orliris, por su colaboración en el desarrollo de los experimentos, su ayuda fue vital para el desarrollo de los mismos.

Tabla de Contenido

LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	10
3.1.1 <i>Obtención de la muestra de intestino</i>	10
3.2 MANEJO Y LIMPIEZA DE LA MUESTRA	11
3.2.1 <i>Método de limpieza según Méndez et al. (2003) (limpieza moderada)</i>	11
3.2.2 <i>Método de limpieza según Singleton et al. (2003) (limpieza intensa)</i>	11
3.3 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	12
3.3.1 <i>Pruebas de crecimiento en medios comerciales</i>	12
3.3.2 <i>Identificación de posibles organismos dependientes de sustancias encontradas en el intestino de O. borincana</i>	12
3.4 PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTES DE CARBONO (BIOLOG)	13
3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE RASTREO (MER)	14
3.6 PRUEBAS MOLECULARES.....	14
3.6.1 <i>Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) total a partir de intestinos de O. borincana</i>	14
3.6.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	15
3.6.3 <i>Prueba de hibridación in situ por fluorescencia (FISH)</i>	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	19
4.1.1 <i>Pruebas de crecimiento en medios comerciales</i>	19
4.1.1.1 <i>Método de limpieza moderada</i>	19
4.1.1.2 <i>Método de limpieza intenso</i>	22
4.2 IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ORGANISMOS DEPENDIENTES DE SUSTANCIAS ENCONTRADAS EN EL INTESTINO DE O. BORINCANA.....	25
4.5.1 <i>Reacción de polimerización en cadena (PCR)</i>	31
4.5.2 <i>Prueba de hibridación in situ por fluorescencia (FISH)</i>	34
5. CONCLUSIONES	37
6 RECOMENDACIONES	39
7 LITERATURA CITADA	40
ANEXO A. PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA I.....	44
ANEXO B. PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA II	45

ANEXO C.	PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA III.....	46
ANEXO D.	PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA IV.....	47

Lista de Tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Características de las cepas bacterianas aisladas del intestino de <i>O. borincana</i> lavado por el método moderado.....	20
Tabla 2. Características de las cepas bacterianas aisladas del intestino de <i>O. borincana</i> tratado por el método de lavado intenso.	24
Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos en los medios de cultivo comercial (MC) y no comercial (MNC) para los dos métodos de limpieza aplicados.....	26
Tabla 4. Comparación de los resultados de microscopía electrónica de la pared intestinal de <i>O. borincana</i> por cada método de lavado.	28
Tabla 5. Identificación molecular de las cuatro cepas bacterianas aisladas de los intestinos de <i>O. borincana</i> tratados por el método de lavado intenso.	33
Tabla 6. Comparación de los resultados de las pruebas moleculares por tipo de lavado.	35

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Tinción Gram de los microorganismos aislados de intestinos de <i>O. borincana</i> tratado por el método de limpieza moderado. 1000x.....	21
Figura 2. <i>Aspergillus</i> sp. aislado del intestino de <i>O. borincana</i> , por el método de limpieza moderado. Izquierda, colonia creciendo en medio PDA. Derecha, microscopía de luz de la cepa de <i>Aspergillus</i> sp. aislada en este estudio.	22
Figura 3. Tinción Gram de los microorganismos aislados de intestinos de <i>O. borincana</i> lavados intensamente. 1000x.	24
Figura 4. Prueba de hemólisis para las cepas aisladas del intestino de <i>O. borincana</i> . C+ y C- son los controles usados (<i>B. cereus</i> y <i>S. epidermidis</i> , respectivamente). M1 a M9 son las cepas aisladas de los intestinos lavados moderadamente. S1-S4 son las cepas aisladas de los intestinos lavados intensamente.	25
Figura 5. Microscopía electrónica de rastreo de la pared intestinal de <i>O. borincana</i> luego de un lavado moderado. Se observan estructuras esféricas con un diámetro aproximado de 1.5 μm . Estas estructuras pueden ser bacterias cocoides o estructuras vegetativas de algún microorganismo.	29
Figura 6. Microscopía electrónica de rastreo de la pared intestinal de <i>O. borincana</i> luego de un lavado moderado. Se observan estructuras filamentosas muy parecidas a las encontradas por Méndez et al. (2003).	29
Figura 7. Microscopía electrónica de rastreo del intestino de <i>O. borincana</i> tratado por el método de limpieza intenso. Se observan arreglos estreptobacilares semejantes a las vistas por Jolly et al., 1993 pero diferentes en tamaño y forma a las vistas por Méndez et al., 2003.	30
Figura 8. Microscopía electrónica de rastreo del intestino de <i>O. borincana</i> tratado por el método lavado intenso, mostrando cadenas de bacilos que parecen estar adheridas a la pared intestinal. Las flechas indican los posibles sitios de contacto entre el bacilo y la pared intestinal de la lombriz.	30
Figura 9. Microscopía electrónica de rastreo de una de las cepas bacterianas aisladas del intestino de <i>O. borincana</i> tratado por el método de limpieza intenso, tomadas a 1000x (derecha) y 5000x (izquierda). La flecha señala la segmentación en la cadena de bacillos.	31
Figura 10. PCR. Amplificación de 16S ADN _r bacteriano a partir del ADN genómico obtenido de los intestinos de <i>O. borincana</i> lavados por el método de lavado intenso. “M” Marcador de peso molecular (λ Hindi III); “1-4” réplicas de la reacción de PCR; “5” control (+); “6” control (-).	33
Figura 11. Fotografías combinadas de microscopía de fluorescencia y Nomarski de cortes transversales del tejido intestinal de <i>O. borincana</i> . A. Tejido intestinal de <i>O. borincana</i> mostrando autofluorescencia a 564 nm longitud de onda de emisión máxima del	

fluoróforo Cy3. **B.** Tejido intestinal de *O. borincana* mostrando autofluorescencia a 528 nm longitud de onda de emisión máxima del fluoróforo oregón verde..... 36

Figura 12. Fotografías combinadas de microscopía de fluorescencia y Nomarsky del tejido intestinal de *O. borincana*. **A.** Corte transversal del intestino de *O. borincana* tratado por el método de lavado intenso, en el que observa hibridación con la sonda EUB 338 marcada con el fluoróforo Cy5 (668 nm). **B.** Corte longitudinal del intestino de *O. borincana* tratado por el método de lavado moderado, mostrando hibridación positiva con la sonda EUB 338 marcada con el fluoróforo Cy5 (668 nm). 36

1 INTRODUCCIÓN

Los oligoquetos terrestres, también conocidos como lombrices de tierra, son en su mayoría organismos geófagos capaces de consumir en un año muchas toneladas de suelo por hectárea. Este hecho hace a las lombrices de tierra miembros importantes de la macrofauna del suelo, específicamente de los procesos que afectan las propiedades físicas del suelo, la descomposición de la materia orgánica y la regulación de los ciclos de carbono y nitrógeno (Egert et al., 2004).

Aproximadamente 3000 especies de oligoquetos son terrestres, algunas otras habitan en ambientes marinos o en agua dulce. Los oligoquetos terrestres se encuentran en casi todo tipo de suelo húmedo especialmente en los ricos en materia orgánica (Meglitsch y Schram, 1991). El detritus vegetal del suelo es la principal fuente nutricional de las lombrices de tierra, aunque se ha encontrado que algunos microorganismos como protozoarios, bacterias y hongos, también son parte de la dieta de estos vermes (Lee, 1985). Esta relación microorganismos-oligoqueto no necesariamente se limita a un proceso de depredación, ya que se ha demostrado que algunos microorganismos no son afectados significativamente por las enzimas digestivas producidas por las lombrices de tierra (Edwards y Fletcher, 1988). Las comunidades procariotas en el tracto intestinal de algunos invertebrados terrestres son muy comunes y han sido relacionadas con mayor capacidad de degradar sustancias complejas encontradas en la materia orgánica del suelo (Fukatsu y Nikoh, 1998).

Parle (1963) confirmó que las lombrices de tierra pueden producir enzimas digestivas como quitinasa y celulasa, mientras que Lee (1985) sugiere que dichas enzimas pueden ser

producidas por microorganismos simbioses como bacterias u hongos. Las comunidades microbianas del intestino de las lombrices de tierra han sido estudiadas aplicando técnicas básicas de cultivo microbiológico (Santiago, 1995), microscopía en muchas de sus modalidades (Křišťůfek et al., 1994) y biología molecular (Singleton et al., 2003), siendo esta última una de las técnicas más usadas en la actualidad. El uso de técnicas moleculares para estudiar las comunidades microbianas presentes en el intestino de los oligoquetos terrestres toma cada vez más auge porque permite identificar de forma más precisa a estos microorganismos y así conocer mejor los hábitos alimentarios y los procesos digestivos de las lombrices de tierra (Singleton et al., 2003).

La microscopía de fluorescencia ha sido usada para estudiar cómo varía la población de bacterias en cada segmento intestinal de los oligoquetos *Aporrectodea caliginosa* y *Lumbricus rubellus* (Křišťůfek et al., 1995). La microscopía electrónica de transmisión (MET) se empleó para analizar las heces y el contenido intestinal de *Lumbricus rubellus* (Křišťůfek et al., 1994). Jolly et al. (1993) usaron microscopía electrónica de rastreo (MER) para estudiar la microflora intestinal de *Lumbricus terrestris* y de *Octolasion cyaneum*.

Borges (1994) describió a *Onychochaeta borincana*, una especie de oligoqueto que hasta el momento sólo ha sido reportada para Puerto Rico. Este organismo se caracteriza por la presencia de quetas en forma de garfio en la parte posterior del cuerpo, lo que la hace un organismo relativamente fácil de identificar bajo el estereoscopio.

Onychochaeta borincana, según la clasificación de Bouché (1972), es un oligoqueto endógeo, que no sale a la superficie y adquiere su alimento de los depósitos minerales y los residuos orgánicos en el suelo. Este verme se caracteriza por ocupar una variedad de hábitats

(Borges, 1994), siendo reportado en lugares con poca o mucha concentración de materia orgánica (Alfaro y Borges, 1996). Este hecho ha despertado el interés de investigadores que piensan que posiblemente albergue un simbiote que asista su proceso digestivo.

Se han hecho investigaciones para identificar los microorganismos presentes en el intestino de este verme y establecer la existencia de una asociación que le confiera a la lombriz una mayor eficiencia digestiva (Alonso et al., 1999; Santiago, 1995). Méndez et al. (2003) describen, por medio de distintas técnicas de microscopía, la presencia de estructuras filamentosas segmentadas (SFB) adheridas a la pared intestinal de *Onychochaeta borincana*, que parecen ser de origen microbiano. Los autores sugieren que estas SFB podrían ser actinomicetos en distintas etapas de desarrollo.

En este trabajo se aplican técnicas moleculares, microbiológicas fisiológicas y de microscopía electrónica de rastreo para identificar y caracterizar la flora bacteriana asociada a la pared intestinal de *O. borincana*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

Bassalik (1913) fue uno de los precursores del estudio microbiológico del contenido intestinal de las lombrices de tierra. Este investigador aisló más de 50 bacterias del canal digestivo de *Lumbricus terrestris* y encontró que nueve de ellas no se hallaban en el suelo circundante.

Se han desarrollado numerosos trabajos sobre la composición de la flora microbiana en el intestino de las lombrices de tierra. Szabó et al. (1976) indican que muy pocas especies, o quizás una sola especie de actinomiceto, forman grandes poblaciones en el intestino de los oligoquetos de tal manera que ocupan un lugar prominente en la microbiota intestinal. Márialigeti (1979) estudió la estructura de la flora microbiana del segmento posterior del intestino de *Eisenia lucens* y encontró que de 473 organismos aislados, el 73% pertenecían al género *Vibrio*, hecho que apoya la idea de Szabó et al. (1976).

Contreras (1980) estudió las poblaciones de actinomicetos en el intestino de *Eisenia lucens* y reportó que el 70% de dicha flora estaba representada por una sola especie, *Streptomyces lipmanii*, un organismo poco frecuente en la naturaleza.

Rashed et al. (1992) realizaron un análisis numérico computadorizado para estudiar la composición del conjunto de microorganismos aislados de la materia fecal del enquitreido *Fridericia hegemon*. Las bacterias y los actinomicetos fueron los microorganismos predominantes en el intestino de este oligoqueto, aunque también encontraron un bacilo gram-positivo que no fue identificado.

Křišťůfek et al. (1992), usando técnicas de conteo en plato y microscopía de fluorescencia, estudiaron los cambios de densidad de las bacterias y los hongos a medida que pasan por el tracto digestivo de *Lumbricus rubellus* y de *Aporrectodea caliginosa*. Encontraron que en *L. rubellus* se incrementa el número de bacterias, actinomicetos y hongos de la parte anterior a la posterior del intestino, mientras que en *A. caliginosa* sucede lo contrario.

Křišťůfek et al. (1993) estudiaron las comunidades de actinomicetos en el intestino de *Lumbricus rubellus*, en el de *Octolasion montanum* y en el suelo circundante. Los autores encontraron varias especies de *Streptomyces*, aunque en ambas lombrices predominaban *Streptomyces diastatochromogenes* y *Streptomyces noglalater*, organismos característicos del suelo. También hallaron una alta densidad de *Micromonospora* en el intestino de *L. rubellus*, pero no en el de *O. montanum* ni en el suelo circundante.

Mediante microscopía electrónica de rastreo y de transmisión, Jolly et al. (1993) demostraron la existencia de un contacto físico entre unas bacterias segmentadas filamentosas (SFB) y la mucosa intestinal de *Octolasion lacteum* y *L. terrestris*. Los resultados mostraron filamentos bacterianos unidos por medio de estructuras de enganche a la pared del intestino de las lombrices, por lo que se concluyó que las bacterias podrían estar adaptadas para vivir en el interior del intestino de la lombriz.

Otro estudio del intestino de *L. rubellus* usando microscopía electrónica de transmisión fue realizado por Křišťůfek et al. (1994). Los investigadores compararon los resultados de microscopía con estudios microbiológicos del suelo circundante al área donde se colectaron las lombrices. En el suelo se encontraron bacterias, actinomicetos, hongos, micelio estéril y

células vegetales, pero en el intestino de la lombriz estos organismos se encontraban lisados excepto algunos actinomicetos, endosporas y bacterias encapsuladas.

Polyanskaya et al. (1996) estudiaron la comunidad de actinomicetos presente en el intestino de *Eisenia fetida*. Concluyeron que *Streptomyces caeruleus* se desarrolla mejor en el intestino de este verme y que ayuda a la lombriz en el metabolismo de la materia orgánica y la degradación de sustancias de origen vegetal.

Shramm et al. (2003) emplearon la técnica de hibridación *in-situ* por fluorescencia y demostraron la existencia de una relación simbiótica entre una bacteria del género *Acidovorax* y las lombrices *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea tuberculata*, *Octolasion lacteum* y *Eisenia fetida*. Esta bacteria forma nódulos en las ámpulas de los nefridios de estas lombrices de tierra ayuda en el proceso de la degradación de proteínas.

El proceso de identificación de bacterias fuertemente asociadas al intestino de las lombrices de tierra (BFAI) se dificulta si estos microorganismos necesitan para su crecimiento condiciones que sólo se dan en el interior del intestino de la lombriz. Es por esto que Singleton et al. (2003) usan técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación y la hibridación *in situ* por fluorescencia para identificar BFAI en *Lumbricus rubellus*. Los investigadores lavaron ocho veces el intestino de *L. rubellus* usando un “vortex”, por lo que se presume que todo organismo que después de los lavados permanezca unido a la pared intestinal de la lombriz debe ser una BFAI. Los filotipos bacterianos asociados a la pared intestinal de la lombriz fueron encontrados en muy baja proporción o estuvieron ausentes en la piel de la lombriz y en el suelo circundante. Por

otro lado los filotipos encontrados tampoco fueron los mismos en todas las lombrices estudiadas.

Onychochaeta borincana ha sido colectada en diversas zonas ecológicas en Puerto Rico, que van del bosque seco subtropical, hasta el bosque muy húmedo montano bajo, y en un intervalo de elevación de 30 a 1097m (Borges, 1994), lo que demuestra la capacidad de este organismo para adaptarse a una gran variedad de ambientes.

Santiago (1995) estudió la flora bacteriana del contenido intestinal de *O. borincana* y encontró siete especies de bacterias del género *Bacillus*: *B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* y *B. pabuli*. Todas estas especies son bacterias típicas del suelo. También encontró que la carga microbiológica de cada región intestinal disminuye de la parte anterior a la posterior, atribuyendo esta variación a las reacciones enzimáticas en el tracto digestivo de la lombriz, ya que es en la parte anterior del mismo donde se lleva a cabo la mayor actividad enzimática. Sin embargo, el investigador encontró que algunas bacterias aumentan en la parte posterior del intestino, quizás porque para muchas bacterias esta porción presenta condiciones adecuadas para su desarrollo.

Alfaro y Borges (1996) encontraron a *O. borincana* en la Reserva Laguna Cartagena, una región que presenta disturbios naturales y antropogénicos. También informan que esta lombriz abunda en suelos arcillosos y que su población en la Laguna Cartagena aumenta de marzo a junio. En ese estudio se encontró que *O. borincana* puede estar presente tanto en suelos con altas concentraciones de materia orgánica (7.51%) como en suelos con concentraciones muy bajas de materia orgánica (1.34%).

Alonso et al. (1999) estudiaron la flora micológica del tubo digestivo de *O. borincana* e identificaron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Gliocadium*, *Paecilomyces* y *Trichoderma*. Estos géneros son típicos descomponedores de materia orgánica y han sido reportados como pertenecientes a la flora normal del suelo. Los autores concluyeron que la flora micótica encontrada en el intestino de *O. borincana* muestra un comportamiento parecido al presente en el suelo circundante donde dominan *Aspergillus* y *Penicillium*.

Hubers et al. (2003) reportan a *O. borincana* en suelos de la serie Nipe caracterizados por ser altamente meteorizados, de pH bastante reducido y poco fértiles. Hubers (1993) sugiere la existencia de una asociación mutualista entre *O. borincana* y un microorganismo del suelo que le permita adaptarse a los distintos hábitats donde ha sido reportada.

Méndez et al. (2003) estudiaron la pared intestinal del tubo digestivo de *O. borincana* usando microscopía electrónica de rastreo y encontraron estructuras cocoides y en forma de bastón (RSB) asociadas, y SFB adheridas al intestino de este oligoqueto. La presencia de SFB y RSB fue constante en la mucosa de la parte anterior del intestino, siendo las primeras más abundantes en esta zona y menos abundante en la parte posterior. Los autores sugieren que la superficie lisa de la parte posterior del intestino ofrece menos posibilidad de adhesión para las SFB, pero las RSB y las estructuras cocoides que no están adheridas a la pared intestinal parecen encontrar un ambiente favorable en la porción posterior. En la región media del intestino los autores describen una gran cantidad de microorganismos, lo que atribuyen a que quizás el epitelio y el muco-polisacárido disminuyen el efecto adverso de las enzimas y permiten la proliferación de los mismos. Los autores también observaron que las SFB se adhieren a la pared intestinal mediante una estructura tipo enchufe (“socket-like”),

por lo que sugieren que quizás puedan ser organismos endógenos de *O. borincana*. Mencionan que las SFB se encuentran en tamaños diferentes, lo que puede representar distintos estados de desarrollo. Por otro lado, tomando en cuenta la porción terminal del filamento, clasifican estas estructuras en dos morfotipos: las de superficie lisa y las de superficie rugosa. Méndez et al., no identificaron estos organismos, pero proponen que los mismos podrían ser actinomicetos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

El sitio de muestreo se ubica en el área boscosa entre el edificio de Ingeniería Civil y el nuevo edificio de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico. Los especímenes se colectaron manualmente, excavando a una profundidad máxima de 40 centímetros.

Los ejemplares se identificaron usando un estereoscopio, seleccionándolos por la presencia de quetas en forma de garfio en la parte posterior del cuerpo. De las 29 especies de oligoquetos terrestres informadas para Puerto Rico (Borges, 1996), *O. borincana* es la única que presenta esta característica.

Se colectaron 37 individuos adultos, los cuales fueron transportados en bolsas Ziplock® hasta el laboratorio. Las lombrices de tierra se mantuvieron por 24 horas en un recipiente con suelo esterilizado tres veces por autoclave (15 psi, 121 °C, 15 min.) para limpiar parcialmente la flora intestinal.

3.1.1 Obtención de la muestra de intestino

Las lombrices fueron sumergidas en agua caliente (60-70 °C) y estéril por 20 segundos y posteriormente fueron disecadas en un gabinete microbiológico de flujo laminar. Se realizó un corte longitudinal del cuerpo de cada lombriz hasta exponer por completo el intestino, el

cual fue separado y colocado en microtubos de 1.5 ml con 1 ml de amortiguador salino de fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.2 (Méndez et al., 2003).

3.2 MANEJO Y LIMPIEZA DE LA MUESTRA

Los intestinos fueron tratados por dos métodos de limpieza: el usado por Méndez et al. (2003) (limpieza moderada) y el empleado por Singleton et al. (2003) (limpieza intensa). El propósito de usar ambos métodos fue identificar cuál permite una mejor limpieza del intestino de *O. borincana*, eliminando la flora transitoria de tal manera que sólo permanezcan aquellos organismos que tienen un fuerte contacto físico con la pared intestinal.

3.2.1 Método de limpieza según Méndez et al. (2003) (limpieza moderada)

Se tomaron 16 intestinos, cada uno de los cuales se limpió internamente utilizando una aguja hipodérmica con agua destilada estéril. Cada intestino se cortó longitudinalmente para exponer su parte interna previo a ser usados en las pruebas microbiológicas.

3.2.2 Método de limpieza según Singleton et al. (2003) (limpieza intensa)

Para este método también se usaron 16 intestinos, los cuales fueron cortados longitudinalmente para facilitar su limpieza. Posteriormente se colocaron en microtubos con 1 ml de (PBS) y se sometieron a 8 lavados aplicando “vortex” por 30 segundos, haciendo cambios de PBS entre cada lavado.

3.3 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Pruebas de crecimiento en medios comerciales

Para esta prueba se usó un total de 16 intestinos, 8 por cada método de limpieza. Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias fueron agar Luria Bertani (LB), agar nutritivo y agar para actinomiceto (Difco®). Para aislar hongos se usó agar de papa y dextrosa (PDA).

Se tomaron dos platos de cada medio y se inoculó un intestino por plato orientando la parte interna del intestino hacia la superficie del medio. Los medios usados para el aislamiento de procariotas fueron incubados a 32 °C, con excepción del medio para actinomiceto el cual se incubó a 30 °C por recomendación del fabricante. El medio para el aislamiento de hongos fue incubado a 25 °C.

El crecimiento en cada plato fue evaluado cada 12 horas durante 72 horas. Se separaron las colonias por sus características microscópicas y a cada una se le realizó tinción Gram, si se tratara de bacterias, o tinción con lactofenol y azul de algodón, si el organismo era un hongo.

3.3.2 Identificación de posibles organismos dependientes de sustancias encontradas en el intestino de *O. borincana*

Se elaboró un medio de cultivo a base de extracto de intestino de *O. borincana* para tratar de identificar organismos que pudiesen necesitar para su crecimiento algunas sustancias que sólo les proporcione el extracto y no un medio comercial. Para la elaboración

de este medio de cultivo, se hizo un homogenizado a partir de cinco intestinos de lombriz. El homogenizado fue esterilizado por filtración para ser usado como fuente nutricional del medio, agregando agar (Difco) como agente solidificante.

Finalmente, se tomaron 4 platos del medio preparado y se inoculó en cada uno un intestino (dos por cada método de limpieza). Los platos se incubaron a 30 °C, verificando el crecimiento cada 24 horas. Se separaron las colonias por morfotipo y a cada una se le realizó tinción Gram o tinción con lactofenol y azul de algodón, según el caso.

3.4 PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTES DE CARBONO (BIOLOG)

El perfil de utilización de fuentes de carbono fue realizado a las cuatro cepas aisladas en las pruebas microbiológicas a partir de los intestinos lavados intensamente. Se usó el método de identificación rápida por BIOLOG®. Las cuatro cepas fueron cultivadas en el medio BUG (Biolog Agar Universal) con 15 g/L de agar y suplementado con 0.25 % de maltosa, y 2 a 3 gotas de tioglicolato. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 16-18 horas. Posteriormente se preparó de cada cepa una suspensión celular en 0.85 % de cloruro de sodio y una a dos gotas de tioglicolato, hasta alcanzar un 20 % de transmitancia. De esta suspensión celular se agregaron 150 µL en cada una de las fosas de un micro-plato GP2 y se incubó el mismo a 32 °C por 22 horas. Los resultados se leyeron usando el “MicroStation and Omnilog” en la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez (doctores Lilliam Casillas y Carlos Ríos Velázquez).

3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE RASTREO (MER)

Se realizó microscopía electrónica de rastreo a los intestinos tratados por los dos métodos de limpieza descritos anteriormente, siguiendo el protocolo de Méndez et al. (2003). Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de rastreo marca JEOL 5410 LV disponible en el Centro de Microscopía del Departamento de Biología del Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico.

3.6 PRUEBAS MOLECULARES

3.6.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) total a partir de intestinos de *O. borincana*

Para la extracción de ADN total se usaron cuatro intestinos de lombriz por cada método de limpieza. El tejido limpio se depositó en un microtubo del equipo “fast-prep®” (Q-Biogen), siguiendo el protocolo para el mismo equipo que se describe brevemente a continuación. Se añadió 200 µl de amortiguador de extracción (Tris-acetato 40mM pH 7.8, acetato de sodio 20mM, EDTA 1.0mM, SDS 1%) y 60 µl de NaCl 5M y se incubaron a 45 °C por 5 minutos en un baño de María. Posteriormente, la mezcla se colocó en un disruptor “fast-prep®” durante 2 ciclos de 30 segundos a una velocidad de 5.5 m/seg.

Luego todos los tubos fueron centrifugados a 16000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se colectó y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml. Se realizó una extracción con un volumen de cloroformo, agitando suavemente y se centrifugó a 16000 x g por 3

minutos. La fase acuosa que quedó en la parte superior fue transferida a un tubo nuevo de 1.5 ml.

El ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó por 12 horas en frío para mayor precipitación. Luego se centrifugó por 5 minutos a 16000 x g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire por 3 minutos. Por último, se resuspendió el ADN en 50 µl de TE 1X [Tris 100mM, EDTA 0.1mM]. La extracción fue corroborada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (0.04M de acetato de tris, 0.001M de ácido etilendiaminotetracético “EDTA”, pH 8.0.).

3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de la extracción de ADN total del intestino de *O. borincana* se realizó la técnica de PCR para amplificar el gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (16S ADNr) de bacterias y arqueas y para el 18S ADNr de hongos. Para realizar esta amplificación se siguió el protocolo descrito por Furlong et al. (2002). Para el proceso de amplificación del 16S ADNr de bacterias se usó 27f [5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'] como “primer forward” y el 1392r [5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3'] como “primer reverse”. Para la amplificación del 16S ADNr de arqueas se usó como “primer forward” 21f [5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3'] y como “primer reverse” 1392r (Furlong et al., 2002). Para amplificar el gen 18S ADNr de hongos se usó como “primer forward” NSI [5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'], y como “primer reverse” NS8 [5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'] (López Ferrer, 2004).

La concentración de los reactivos en cada reacción de PCR fue: amortiguador de PCR 1X, cloruro de magnesio 2.5mM, dNTP's 0.25mM, iniciadores 0.5pmol sulfóxido de dimetilo "DMSO" 1 % y Taq ADN polimerasa 0.03 U/ μ L. Cada reacción se colocó en un termociclador GeneAmp® PCR system 2700 de "Applied Biosystem Company". En el caso de la amplificación del 16S ADNr de bacterias, se usaron los siguientes parámetros: la primera desnaturalización se llevo a cabo a 94 °C por 3 minutos y 31 ciclos de desnaturalización a 94 °C 30 segundos, hibridación 48 °C por un minuto y extensión 72 °C 1.5 minutos, y para finalizar un último periodo de extensión a 72 °C por 10 minutos.

Los parámetros usados en las reacciones de PCR del 18S ADNr de hongos fueron: primera desnaturalización 94 °C por 3 minutos y 31 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 45 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1.5 minutos; se aplicó una extensión final a 72 °C por 10 minutos. La verificación de amplificación se realizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

3.6.3 Prueba de hibridación in situ por fluorescencia (FISH)

La secuencia usada como sonda en la hibridación fue EUB338 [GCTGCCTCCCGTAGGAGT] (Singleton et al., 2003) marcada en el extremo 5 primo con el fluoróforo Cy5TM. La prueba FISH se empleó para corroborar la existencia de bacterias adheridas a la pared intestinal de *O. borincana*. Para la realización de esta prueba se siguieron los procedimientos descritos por Dubilier et al. (1995) y Fukatsu y Nikoh (1998) con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

Ocho organismos vivos se sacaron del suelo estéril y se sumergieron en agua caliente (60-70 °C) por 20 segundos. Posteriormente se colocaron en un tubo de ensayo con 10 ml de glutaraldehído al 4 % en amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.2 por 24 horas. Luego se disecaron como se describió en la parte de la preparación de la muestra y los intestinos se colocaron en la solución fijadora a 4 °C por 24 horas. Después, cuatro intestinos fueron limpiados por el método de lavado moderado y cuatro por el método de lavado intenso. Finalmente, los intestinos se deshidrataron en etanol de 10 % a 100 % con intervalos de 15 %, permaneciendo 15 minutos en cada cambio de concentración.

Después de la deshidratación, los fragmentos de intestino fueron embebidos en parafina. A cada muestra se le realizaron cortes de 10 a 15 μm de espesor usando un micrótopo Spencer de American Optical Corporation. Cada corte fue montado en una laminilla previamente tratada según descrito por Almodóvar (1998) y se le removió la parafina enjuagándolo en xileno concentrado. Luego, cada laminilla se secó al aire y las muestras se rehidrataron en etanol desde 100 % hasta 10 % con intervalos de 15 %, permaneciendo 15 minutos en cada cambio de concentración.

Cada una de las laminillas con los cortes se colocó en ácido clorhídrico (HCl) 0.2M por 15 minutos, se enjuagó por 10 minutos en amortiguador de prehibridación (20mM Tris, pH 8.0), se adicionó proteinasa k hasta una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó por 3 minutos a 37 °C, se lavó por 5 minutos con 0.2X de SET (0.75M NaCl, 5mM EDTA, 0.1M Tris buffer pH 7.8) a 42 °C y se posfijó por 5 minutos en 3.7 % de glutaraldehído en amortiguador de prehibridación.

La hibridación se hizo agregando a la laminilla 150 μ l de amortiguador de hibridación (20mM Tris-HCl pH 8.0, 0.9M NaCl, 0.01% dodecil sulfato de sodio (SDS), 30% formamida) que contenía el oligonucleótido marcado a una concentración de 50 pmol por mililitro. Seguidamente, se le colocó un cubreobjeto a cada laminilla y éstas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 12 horas. Todo este proceso se realizó en oscuridad.

Las laminillas se observaron en un microscopio confocal marca Fluoview FV 300 *Confocal Laser Scanning Microscope*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

4.1.1 Pruebas de crecimiento en medios comerciales

4.1.1.1 *Método de limpieza moderada*

Se aislaron nueve cepas bacterianas de los intestinos lavados moderadamente. Las cepas crecieron en todos los medios de cultivo sin mostrar especificidad por ninguno de ellos. Ocho de las nueve cepas aisladas fueron gram-positivas y una gram-negativas, todas con morfología bacilar (Tabla 1, Figura 1). Estos resultados concuerdan con los reportados por Santiago (1995) quien encontró siete especies de *Bacillus* en el intestino de *O. borincana*. Sin embargo, todas las especies reportadas por Santiago fueron gram-positivas, mientras que en este estudio una de las cepas aisladas fue gram-negativa. Este resultado está de acuerdo con el obtenido por Jolly et al. (1993) quienes reportan bacilos gram-negativos asociados a la pared intestinal de *Lumbricus terrestris* y *Octolasion cyaneum*.

El medio PDA usado para evaluar el crecimiento de hongos permitió aislar una cepa de *Aspergillus sp.* (Figura 2). Este género fue reportado en el intestino de *O. borincana* por Alonso et al. (1999) junto con otros géneros, como *Fusarium* y *Trichoderma*, los cuales también forman parte de la flora normal del suelo.

Tabla 1. Características de las cepas bacterianas aisladas del intestino de *O. borincana* lavado por el método moderado.

Cepa	Arreglo	Gram	Esporas	TSIA	Manitol	V-P	Catalasa	Hemólisis	Movilidad*
M1	Bacilo	+	+	α^+/α^+	+	-	+	β -Hemólisis	-
M2	Bacilo	+	-	α^+/α^+	+	-	+	γ -Hemólisis	-
M3	Estreptobacilo	+	+	α^+/α^+	+	+	+	β -Hemólisis	-
M4	Bacilo	+	+	α^-/α^+	-	+	+	β -Hemólisis	-
M5	Bacilo	+	+	α^+/α^+	+	-	+	β -Hemólisis	+
M6	Esterptobacilo	+	+	α^+/α^+	+	+	+	β -Hemólisis	+
M7	Estreptobacilo	+	+	α^+/α^+	+	-	+	β -Hemólisis	+
M8	Cocobacilo	+	+	α^-/α^+	+	+	+	β -Hemólisis	-
M9	Cocobacilo	-	-	α^+/α^+	+	-	+	γ -Hemólisis	-

*Por montaje de gota colgante.

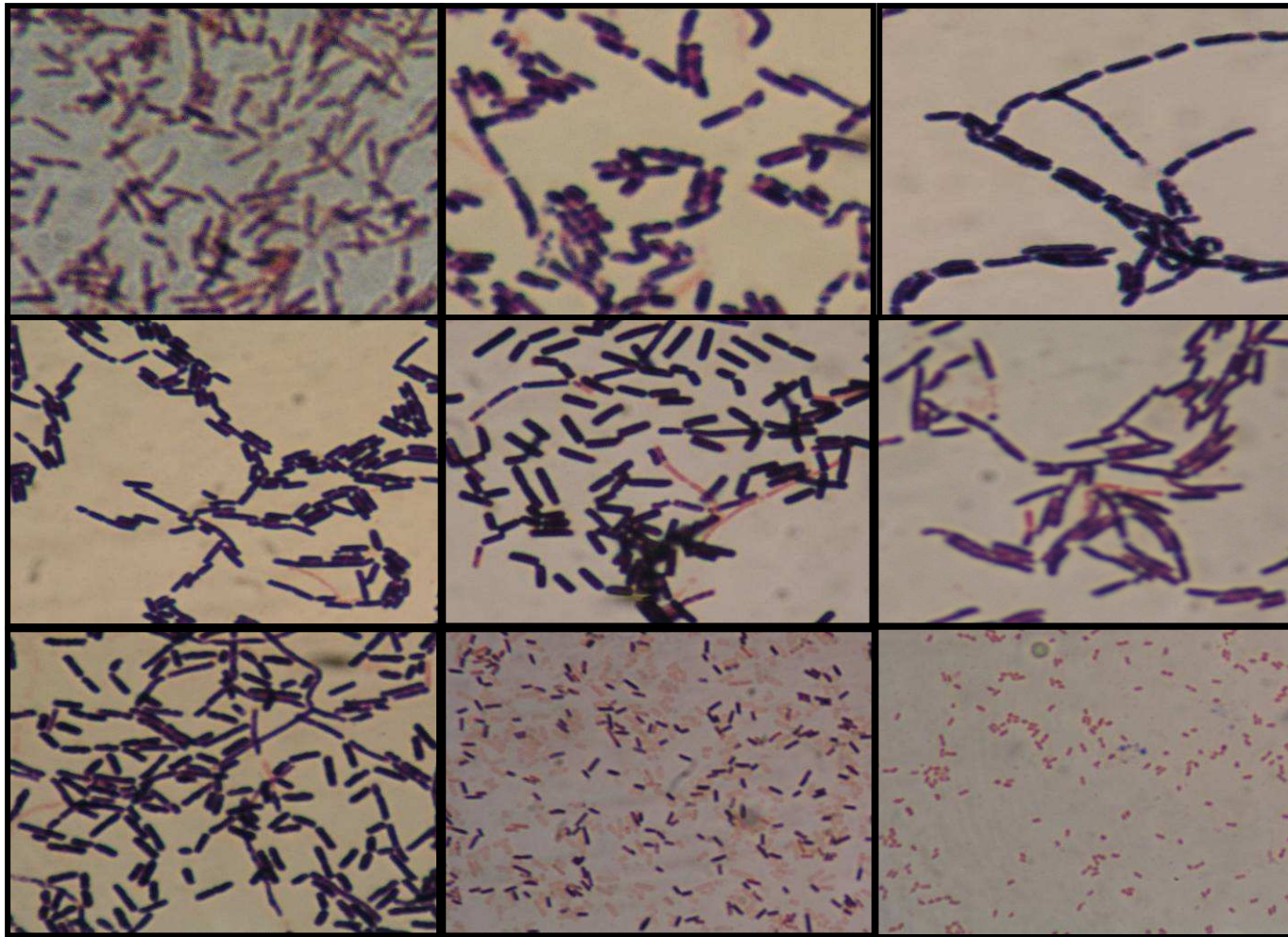


Figura 1. Tinción Gram de los microorganismos aislados de intestinos de *O. borincana* tratado por el método de limpieza moderado. 1000x.



Figura 2. *Aspergillus* sp. aislado del intestino de *O. borincana*, por el método de limpieza moderado. Izquierda, colonia creciendo en medio PDA. Derecha, microscopía de luz de la cepa de *Aspergillus* sp. aislada en este estudio.

4.1.1.2 *Método de limpieza intenso*

Se aislaron cuatro cepas bacterianas de los intestinos lavados intensamente, todas con morfología bacilar, gram-positivas y productoras de endosporas. Las cuatro cepas mostraron morfología parecida a cuatro de los nueve microorganismos aislados de los intestinos tratados por el método de lavado moderado (Tabla 2, Figura 3). La presencia de microorganismos baciliformes en ambos métodos de lavado corroboran los resultados obtenidos por Santiago (1995) y Jolly et al. (1993).

Muchas bacterias del suelo y más aún, del intestino de animales relacionados al suelo, son organismos anaerobios estrictos mientras que otros son facultativos. Se ha reportado que las lombrices de tierra *Lumbricus rubellus* y *Octolasion lacteum* (Karsten y Drake 1994; Karsten y Drake 1997; Matthies et al., 1999) tienen en su intestino bacterias anerobias estrictas. En este trabajo se constató que tres de las cuatro cepas aisladas pueden crecer tanto

en condiciones aerobias como anaerobias. Dos de estas cuatro cepas son β -hemolíticas y dos son γ -hemolíticas (Figura 4). El perfil de utilización de fuentes de carbono (BIOLOG) de estas cuatro cepas muestra que dos de ellas son 98% similares al grupo de *Bacillus cereus* mientras que las otras dos sólo muestran similaridad con el género *Bacillus* (Tabla 2. ver Anexos).

Varios estudios de lombrices de tierra (Jolly et al., 1993; Santiago, 1995) y de artrópodos del suelo (Margulis et al.,1998) han demostrado la presencia de bacterias baciliformes en los intestinos de estos organismos. Este dato es corroborado en este estudio, ya que todas las cepas bacterianas aisladas de los intestinos tratados por ambos métodos de limpieza tienen morfología bacilar. De hecho, dos de las cepas obtenidas con el lavado intenso pertenecen al grupo de *Bacillus cereus*, una bacteria común en el suelo (Vilain et al., 2006) que ha sido reportada como simbiote intestinal de artrópodos del suelo (Margulis et al., 1998, Feinberg et al., 1999).

Una parte no cubierta en este trabajo fue la microflora anaerobia estricta asociada a la pared intestinal de *O. borincana*. Algunas investigaciones han demostrado la presencia de bacterias anaerobias estrictas en el intestino de lombrices de tierra (Horn et al., 2003) por lo que es posible que *O. borincana* posea microorganismos anaerobios estrictos como parte de su flora intestinal. Para demostrar esto, es necesario emplear un gabinete de anaerobiosis que permita disecar la lombriz bajo condiciones anaerobias, evitando la muerte microorganismos anaerobios estrictos por intoxicación con oxígeno. Por otro lado, las estructuras filamentosas segmentadas vistas por Méndez et al. (2003) podrían ser parte de la flora endógena anaerobia estricta de *O. borincana* sin descartar la posibilidad de que dichas estructuras sean, como los

autores lo sugieren, algún tipo de actinomiceto con requerimientos anaerobios para su crecimiento.

Tabla 2. Características de las cepas bacterianas aisladas del intestino de *O. borincana* tratado por el método de lavado intenso.

Cepa	Arreglo	Gram	Esporas	TSIA	Manitol	V-P	Catalasa	Hemólisis	Movilidad*	BIOLOG
S1	Estreptobacilo	+	+	α^-/α^+	-	+	+	β -Hemólisis	+	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> A
S2	Bacilo	+	+	α^-/α^+	-	+	+	β -Hemólisis	+	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> C
S3	Estreptobacilo	+	+	α^-/α^+	-	-	+	β -Hemólisis	+	<i>Bacillus sp.</i>
S4	Estreptobacilo	+	+	α^-/α^+	-	+	+	β -Hemólisis	+	<i>Bacillus sp.</i>

*Por montaje de gota colgante.

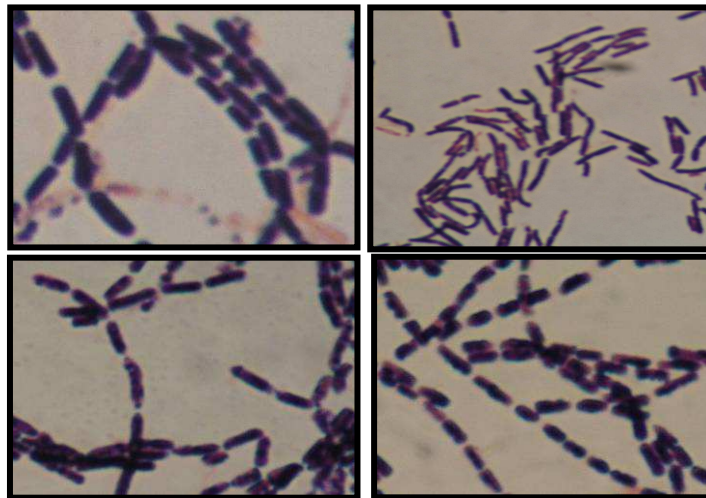


Figura 3. Tinción Gram de los microorganismos aislados de intestinos de *O. borincana* lavados intensamente. 1000x.

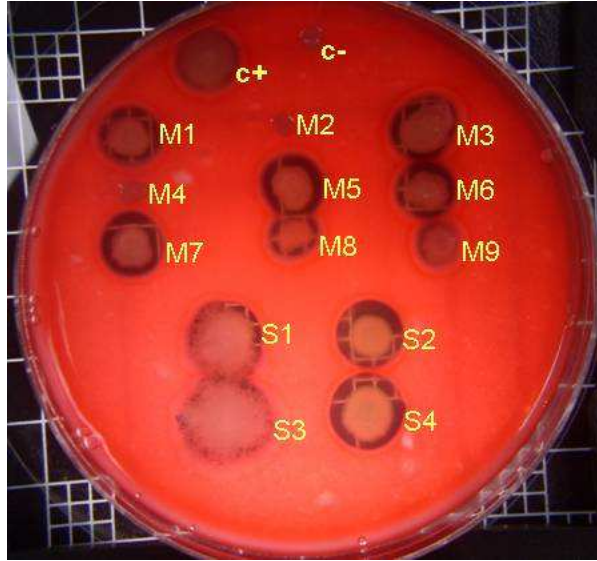


Figura 4. Prueba de hemólisis para las cepas aisladas del intestino de *O. borincana*. C+ y C- son los controles usados (*B. cereus* y *S. epidermidis*, respectivamente). M1 a M9 son las cepas aisladas de los intestinos lavados moderadamente. S1-S4 son las cepas aisladas de los intestinos lavados intensamente.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ORGANISMOS DEPENDIENTES DE SUSTANCIAS ENCONTRADAS EN EL INTESTINO DE *O. borincana*

Para ninguno de los tratamientos de limpieza se pudo aislar un organismo diferente a los aislados en medios de cultivo comercial (Tabla 3). El tiempo de formación de una colonia microbiana visible fue de 36 horas, mientras que en medios comerciales fue de 18 horas, lo que puede atribuirse a que las bacterias aisladas en el medio no convencional no encuentran, en este medio un suministro de nutrientes adecuado que les permita un rápido desarrollo como el observado en los medios comerciales.

Todos los microorganismos aislados en el medio con extracto de lombriz fueron semejantes morfológicamente a los aislados por los otros medios utilizados, lo que indica que no se encontró un organismo cultivable que dependa exclusivamente de algún compuesto presente en el intestino de *O. borincana*. No obstante, la preparación de un medio de cultivo no convencional para el cultivo de bacterias relacionadas al intestino de oligoquetos debe ser estudiado más ampliamente, pues se ha demostrado que las condiciones internas del intestino de los oligoquetos son apropiadas para el desarrollo de muchos microorganismos (Horn et al., 2003).

Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos en los medios de cultivo comercial (MC) y no comercial (MNC) para los dos métodos de limpieza aplicados.

morfología-tinción Gram	Lavado moderado		Lavado intenso	
	MC	MNC	MC	MNC
Bacilos gram +	8	8	4	4
Bacilos gram -	1	1	0	0

4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE RASTREO

La microscopía electrónica de rastreo de los intestinos tratados por el método de lavado moderado muestra la presencia de estructuras en forma de bacterias cocoides, bacilares y filamentosas (Figuras 5 y 6). En los intestinos tratados por el método de lavado intenso sólo se observaron estructuras semejantes a bacterias bacilares (Figuras 7 y 8). Las fotos muestran lo que parecen ser sitios de contacto con la pared intestinal de la lombriz (Figura 8). Las cuatro cepas aisladas de los intestinos lavados intensamente muestran morfología similar al ser vistas en microscopía electrónica de rastreo, apareciendo como cadenas de bacilos (Figura 9). Todas las estructuras observadas por microscopía electrónica en los intestinos tratados por el método antes mencionado muestran morfología parecida a lo visto por Jolly et al. (1993), particularmente en la segmentación de las estructuras. Por otro lado, los resultados microbiológicos demostraron que los cuatro microorganismos aislados por el segundo método de lavado son productores de endosporas y, como lo sugieren Jolly et al. (1993), estas endosporas pueden ser parte de las estructuras cocoides. Sin embargo, las SFB observadas por Méndez et al. (2003) en el intestino de *O. borincana* sólo se pudieron observar aquí en los intestinos lavados por el método descrito por estos investigadores, y no en los tratados con el método de lavado intenso (Tabla 4). Probablemente esto se debe a que el tipo de contacto entre estas estructuras y la pared del intestino de la lombriz no resiste lavados tan fuertes como el usado.

Tabla 4. Comparación de los resultados de microscopía electrónica de la pared intestinal de *O. borincana* por cada método de lavado.

Estructuras	Tipo de lavado	
	Moderado	Intenso
Esféricas	+	-
Estreptobacilares	+	+
SFB	+	-

Microorganismos baciliformes han sido reportados adheridos a la pared intestinal de muchos artrópodos relacionados al suelo. Margulis et al. (1998) reportan a *Bacillus cereus* como un posible endosimbionte intestinal de más de 25 especies de artrópodos, y muestran fotografías de microscopía electrónica que demuestran la presencia de estructuras bacilares adheridas a la pared intestinal de los organismos estudiados.

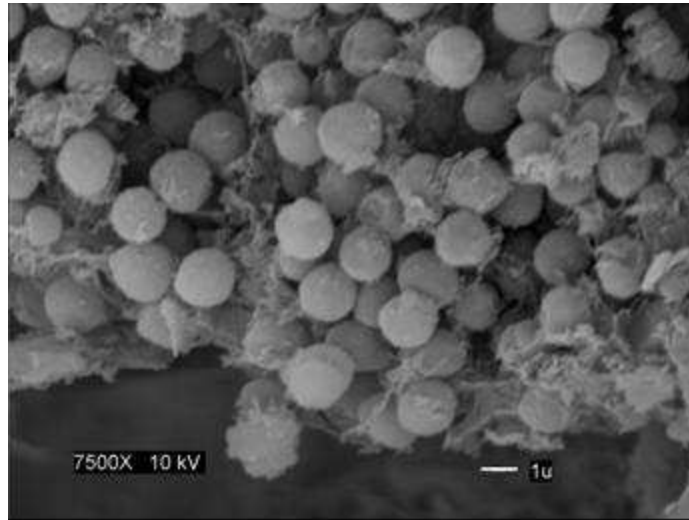


Figura 5. Microscopía electrónica de rastreo de la pared intestinal de *O. borincana* luego de un lavado moderado. Se observan estructuras esféricas con un diámetro aproximado de 1.5 μm . Estas estructuras pueden ser bacterias cocoides o estructuras vegetativas de algún microorganismo.

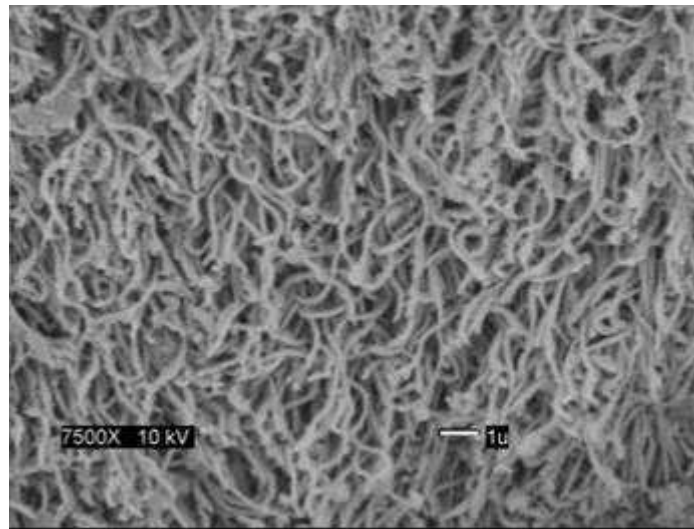


Figura 6. Microscopía electrónica de rastreo de la pared intestinal de *O. borincana* luego de un lavado moderado. Se observan estructuras filamentosas muy parecidas a las encontradas por Méndez et al. (2003).

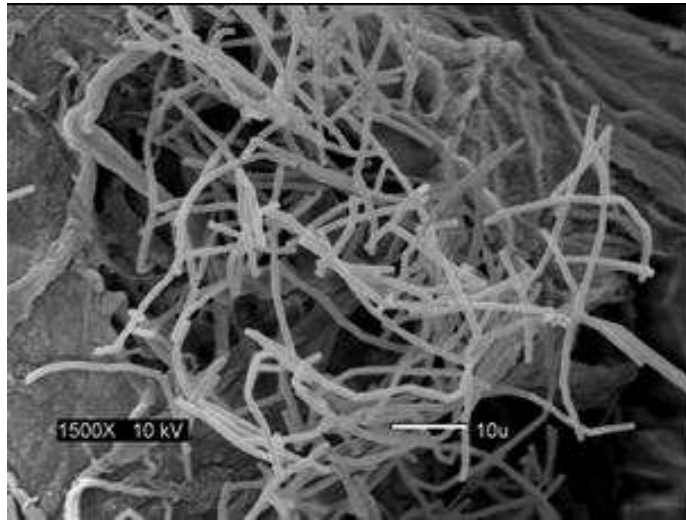


Figura 7. Microscopía electrónica de rastreo del intestino de *O. borincana* tratado por el método de limpieza intenso. Se observan arreglos estreptobacilares semejantes a las vistas por Jolly et al., 1993 pero diferentes en tamaño y forma a las vistas por Méndez et al., 2003.

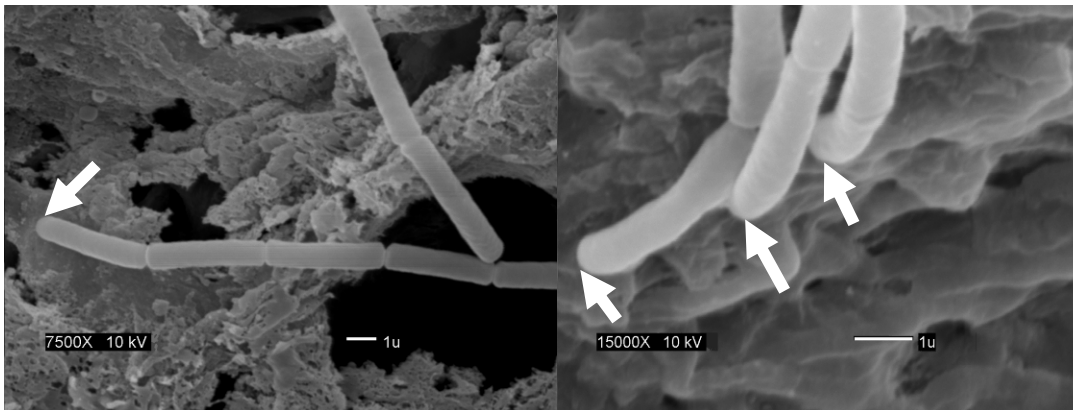


Figura 8. Microscopía electrónica de rastreo del intestino de *O. borincana* tratado por el método lavado intenso, mostrando cadenas de bacilos que parecen estar adheridas a la pared intestinal. Las flechas indican los posibles sitios de contacto entre el bacilo y la pared intestinal de la lombriz.

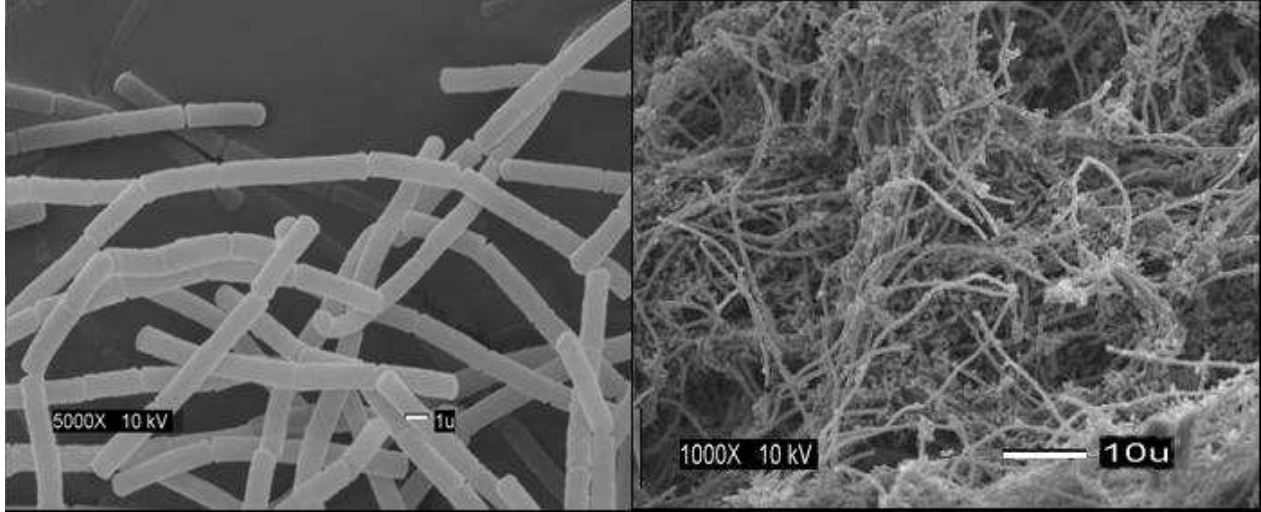


Figura 9. Microscopía electrónica de rastreo de una de las cepas bacterianas aisladas del intestino de *O. borincana* tratado por el método de limpieza intenso, tomadas a 1000x (derecha) y 5000x (izquierda). La flecha señala la segmentación en la cadena de bacilos.

4.4 PRUEBAS MOLECULARES

4.5.1 Reacción de polimerización en cadena (PCR)

Las reacciones de PCR del 16S ADN_r a partir del ADN extraído de los intestinos tratados por el método de lavado moderado mostraron una amplificación de aproximadamente 1500 pares de bases. Este producto se secuenció mostrando un alto número de bases indeterminadas, lo que puede deberse a la diversidad de microorganismos que permanecen en el intestino aún después de haberse lavado, hecho que es corroborado por los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas y de microscopía electrónica de rastreo.

La prueba de PCR fue negativa para todos los ensayos realizados a los intestinos tratados por el método de lavado intenso. Se realizaron curvas de magnesio desde 2.0 hasta 3.0 mM, se usaron diferentes reactivos que ayudan en la eficiencia de la reacción (como DMSO y albúmina de suero bovino “BSA”), se variaron las temperaturas de hibridación, se limpió el ADN pasándolo a través de una columna de cromatografía de Sephadex G50 para eliminar ácidos húmicos, y en ninguno de los casos se vio una amplificación al correr el producto de la reacción en una gel de electroforesis de agarosa al 1.2 % (Figura 10). Se diseñó un control positivo para determinar si la técnica se usó correctamente o si hay algún tipo de inhibidor en la muestra. Este control positivo consistió en agregar a tres intestinos de *O. borincana* lavados intensamente, 150 μ L de un cultivo saturado de bacterias y luego continuar con el proceso ordinario de extracción de ADN, para usarlo posteriormente como ADN muestra de la reacción positiva.

Las cuatro cepas aisladas de los intestinos tratados por el método de lavado intenso fueron identificadas molecularmente por medio de la amplificación y posterior secuenciación del gen del 16S ADNr, arrojando los resultados reportados en la (Tabla 5). Estos resultados indican que los microorganismos aislados forman parte del grupo de *Bacillus cereus*, hecho que sugiere una relación simbiótica entre esta bacteria y *O. borincana*.

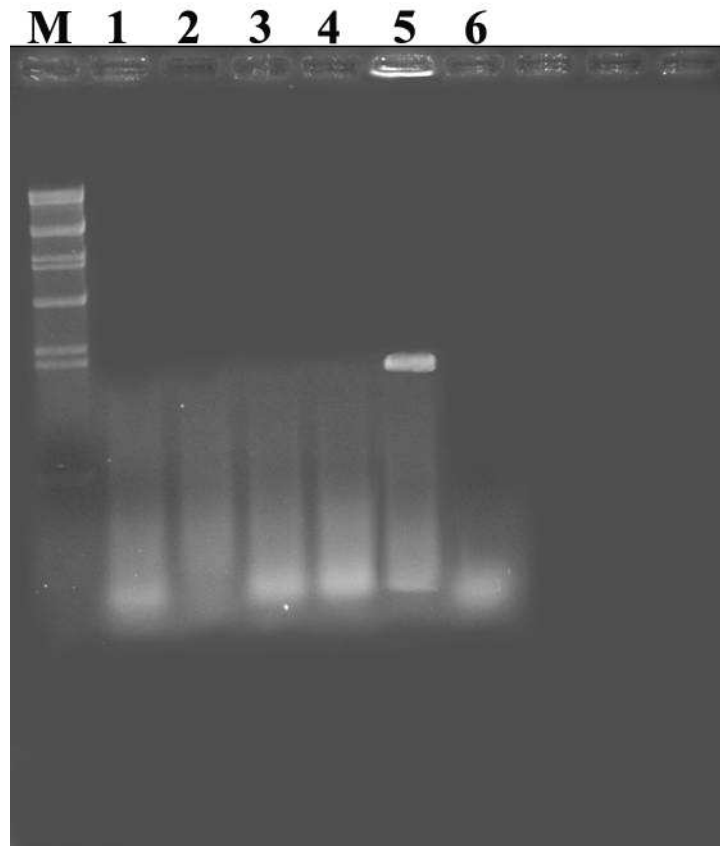


Figura 10. PCR. Amplificación de 16S ADNr bacteriano a partir del ADN genómico obtenido de los intestinos de *O. borincana* lavados por el método de lavado intenso. “M” Marcador de peso molecular (λ Hindi III); “1-4” réplicas de la reacción de PCR; “5” control (+); “6” control (-).

Tabla 5. Identificación molecular de las cuatro cepas bacterianas aisladas de los intestinos de *O. borincana* tratados por el método de lavado intenso.

CEPA	Identificación molecular	Conteo	Valor de e
1	<i>Bacillus</i> sp.	656	0.0
2	<i>Bacillus</i> sp.	115	2e-22
3	<i>Bacillus</i> sp.	896	0.0
4	<i>Bacillus</i> sp.	444	2e-122

4.5.2 Prueba de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH)

Luego de realizados todos los pasos para la hibridación, se observó al microscopio que el tejido intestinal de *O. borincana* era autofluorescente (Figura 11 a-b) en casi todas las longitudes de onda excepto a 668 nm, que es la máxima longitud de onda de emisión del fluoroforo Cy5. Por esta razón se empleó este fluorocromo para la hibridación.

Todos los cortes realizados a los intestinos tratados por el método de lavado intenso mostraron no hibridación observable para la presencia de bacterias adheridas a la pared intestinal de *O. borincana* (Figura 12a), mientras que los cortes hechos a los intestinos tratados por el método de lavado moderado mostraron una hibridación positiva, indicando la presencia de bacterias en el interior del intestino (Figura 12b). El patrón de fluorescencia observado es disperso, apareciendo tanto sobre el tejido intestinal como en los espacios carentes de tejido, lo que hace pensar que esta fluorescencia podría deberse a microorganismos no asociados al intestino, sino transitorios que no fueron removidos durante los lavados.

Los resultados de la prueba de PCR y los de FISH fueron positivos para los intestinos tratados por el método de lavado moderado, y negativos para los intestinos tratados por el método de lavado intenso (Tabla 6). Estos resultados pueden indicar que *O. borincana* no posee una flora con una asociación lo bastante fuerte como para soportar los lavados realizados. Por otro lado, la autofluorescencia del tejido intestinal de la lombriz afecta grandemente las observaciones de los resultados de FISH, al obligar a la reducción de la interferencia causada por la fluorescencia del tejido, hecho que inevitablemente reduce las

probabilidades de observación de un resultado positivo. Sin embargo, si después del lavado intenso esta lombriz posee algún microorganismo adherido a su pared intestinal el mismo estaría en tan baja concentración que no permitiría obtener un resultado visible en estas pruebas.

En general, los resultados microbiológicos microscópicos y moleculares apoyan la idea de que el método de limpieza moderada permite que muchos microorganismos permanezcan dentro del intestino después del lavado, produciendo resultados incorrectos para los propósitos de esta investigación. En el caso de los intestinos lavados intensamente, los resultados moleculares no son consistentes con los resultados microscópicos y microbiológicos, aunque corroboran que este procedimiento de limpieza permite que los microorganismos sin ningún grado de asociación, o con una asociación “débil” con el intestino de la lombriz, sean removidos más eficientemente que con el método de lavado moderado.

Tabla 6. Comparación de los resultados de las pruebas moleculares por tipo de lavado.

Prueba	Tipo de Lavado	
	Moderado	Intenso
PCR 16S ADNr	+	-
FISH	+	-

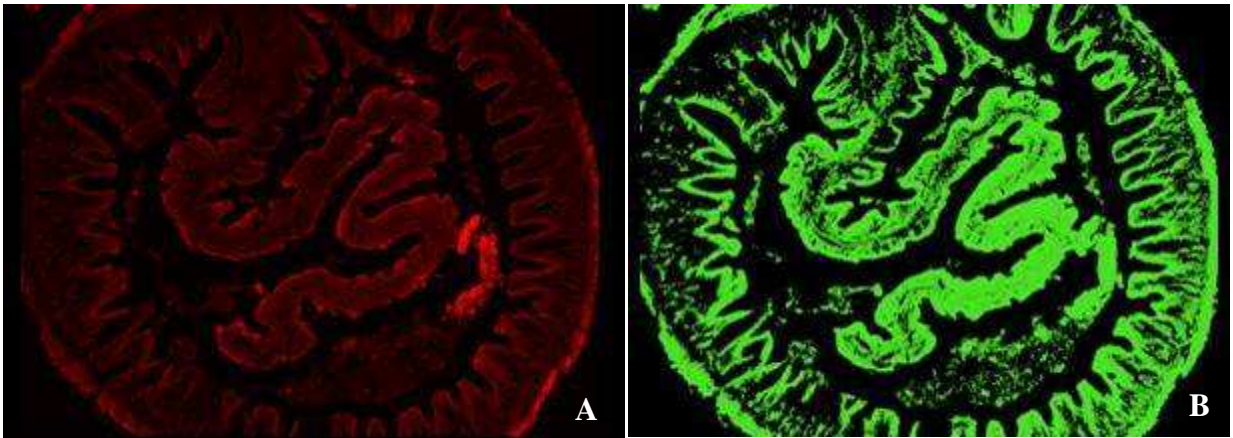


Figura 11. Fotografías combinadas de microscopía de fluorescencia y Nomarski de cortes transversales del tejido intestinal de *O. borincana*. **A.** Tejido intestinal de *O. borincana* mostrando autofluorescencia a 564 nm longitud de onda de emisión máxima del fluoróforo Cy3. **B.** Tejido intestinal de *O. borincana* mostrando autofluorescencia a 528 nm longitud de onda de emisión máxima del fluoróforo oregón verde.

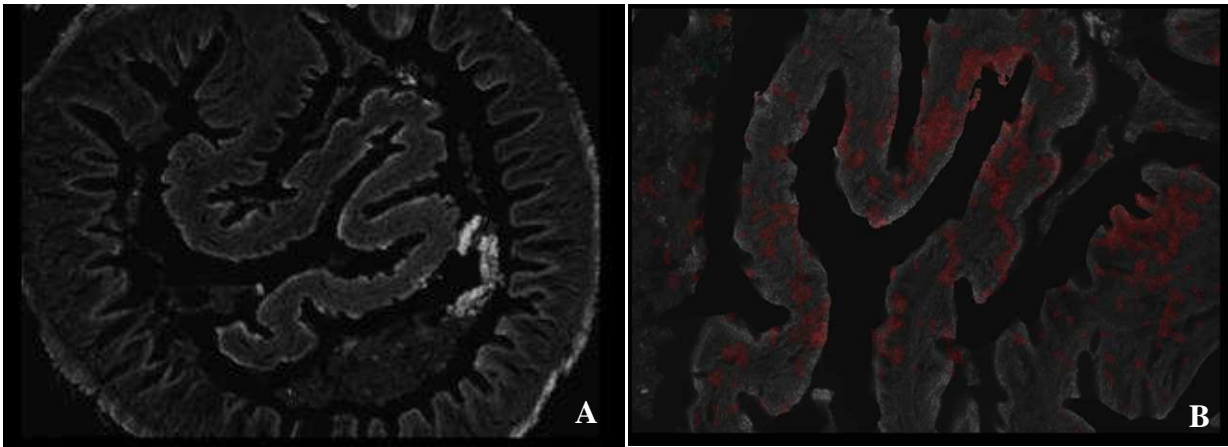


Figura 12. Fotografías combinadas de microscopía de fluorescencia y Nomarsky del tejido intestinal de *O. borincana*. **A.** Corte transversal del intestino de *O. borincana* tratado por el método de lavado intenso, en el que observa hibridación con la sonda EUB 338 marcada con el fluoróforo Cy5 (668 nm). **B.** Corte longitudinal del intestino de *O. borincana* tratado por el método de lavado moderado, mostrando hibridación positiva con la sonda EUB 338 marcada con el fluoróforo Cy5 (668 nm).

5. CONCLUSIONES

De los dos métodos de limpieza evaluados, el método de lavado intenso permitió una mayor limpieza intestinal, dejando en el intestino de *O. borincana* sólo los microorganismos fuertemente asociados. Por otro lado, no fue posible aislar organismos que dependan exclusivamente de compuestos presentes en el intestino de *O. borincana*.

Se aislaron cuatro cepas bacterianas de los intestinos de *O. borincana*, luego de éstos ser lavados intensamente. Estas cuatro cepas fueron identificadas como pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus*, bacteria que ha sido reportada como simbiote intestinal de varios organismos del suelo. Además, las pruebas de microscopía electrónica de rastreo demuestran que unas estructuras bacilares en forma de estreptobacilos permanecen asociadas al intestino de *O. borincana* después de éstos haber sido lavados intensamente.

Las pruebas moleculares indican que la adhesión de estos bacilos a la pared intestinal no es lo suficientemente fuerte para soportar un lavado intenso; hecho que puede atribuirse a que *B. cereus* es una bacteria común en el suelo lo que la convierte en una fuente renovable para *O. borincana* de ser esta bacteria importante para su proceso digestivo.

Las pruebas de hibridación *in situ* por fluorescencia muestran que el tejido intestinal de *O. borincana* es autofluorescente.

Finalmente, fue posible aislar cuatro organismos fuertemente asociados a la pared intestinal de *O. borincana*. Los mismos son bacilos gram-positivos, formadores de

endosporas, β -hemolíticos, y de acuerdo a los resultados moleculares pertenecientes al género *Bacillus*.

La relación entre *Bacillus cereus* y *O. borincana*, si alguna, debe ser estudiada con mayor profundidad para establecer los beneficios o perjuicios que esta asociación pueda causarle a los organismos involucrados.

6 RECOMENDACIONES

Algunos microorganismos anaerobios estrictos forman parte de la microflora intestinal de algunas lombrices de tierra. Sería interesante estudiar la microflora anaerobia estricta asociada al intestino de *O. borincana* y comparar los resultados que se obtengan con los resultados encontrados en los estudios hasta ahora realizados sobre la microflora asociada al intestino de *O. borincana*.

Es recomendable continuar estudios de microscopía que permitan corroborar el contacto físico entre cualquier tipo de microorganismos y el intestino de *O. borincana*. También se debe tratar de extrapolar estos trabajos a otras lombrices de tierra de Puerto Rico y en diferentes tipos de suelo, para buscar distintas asociaciones microorganismo-lombriz que permitan comprender mejor los procesos de descomposición y reciclaje en los participantes oligoquetos terrestres.

Ya que los resultados de este trabajo sugieren algún tipo de relación entre *B. cereus* y *O. borincana*, es recomendable realizar estudios que permitan identificar las funciones digestivas en esta lombriz que puedan ser afectadas por la presencia o ausencia de esta bacteria en el tracto digestivo.

7 LITERATURA CITADA

- Alfaro, M., S. Borges, 1996. Ecological aspects of earthworms from Laguna Cartagena, Puerto Rico. *Carib. J. Sci.*, 32(4): 406-412.
- Almodóvar, J., 1998. Estudios estructurales en especies de *Utricularia* (Lentibulariaceae) en la reserva natural de la Laguna Tortugero, Puerto Rico. Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez.
- Alonso, A., S. Borges, C. Betancourt, 1999. Mycotic flora of the intestinal tract and soil inhabited by *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). *Pedobiologia*, 43: 1-3.
- Bassalik, K., 1913. On silicate decomposition by soil bacteria. *Z. Gärungs-physiol.*, 2: 1-32.
- Borges, S., 1994. A new species of *Onychochaeta* Beddard, 1891 (Oligochaeta: Glossoscolecidae) from Puerto Rico. *Carib. J. Sci.*, 30(3-4): 203-205.
- Borges, S., 1996. The terrestrial oligochaetes of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 776: 239-248.
- Bouché, M., 1972. *Lombriciens de France: Ecologie et Systématique*. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France. I.N.R.A. Publ.72-2.
- Contreras, E., 1980. Studies on the Intestinal Actinomycete Flora of *Eisenia lucens* (Annelida: Oligochaeta). *Pedobiologia*, 20: 411-416.
- Dubilier, N., O. Giere, D.L. Distel, C.M. Cavanaugh, 1995. Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta, Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6): 2346-2350.
- Edwards, C.A., K.E. Fletcher, 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agric. Ecos. Environm.*, 24: 235-247.
- Egert, M., S. Marhan, B. Wagner, S. Scheu, M.W. Friedrich, 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol.*, 48: 187-197.

- Feinberg, L., J. Jorgensen, A. Haselton, A. Pitt, R. Rudner, L. Margulis, 1999. Arthromitus (*Bacillus cereus*) symbionts in the cockroach *Blaberus giganteus*: dietary influences on bacterial development and population density. *Symbiosis*, 27: 104–123.
- Fukatsu, T., N. Nikoh, 1998. Two intracellular symbiotic bacteria from the Mulberry Psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10): 3599-3606.
- Furlong, M., D. Singleton, D. Coleman, W. Whitman, 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and cast of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3): 1265-1279.
- Horn, M.A., A. Schramm, H.L. Drake, 2003. The Earthworm Gut: an Ideal Habitat for Ingested N₂O-Producing Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1662–1669.
- Ubres, H., 1993. Fauna oligoquetológica de suelos de la serie Nipe en el Bosque Estatal de Maricao. Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez.
- Ubres, H., S. Borges, M. Alfaro, 2003. The oligochaetofauna of the Nipe soils in the Maricao State Forest, Puerto Rico. *Pedobiologia*, 47: 475-478.
- Jolly, J.M., H.M. Lappin-Scott, J.M. Anderson, C.D. Clegg, 1993. Scanning electron microscopy of two earthworms: *Lumbricus terrestris* and *Octolasion cyaneum*. *Microb. Ecol.*, 26: 235-245.
- Karsten, G.R., H.L. Drake, 1994. Comparative Assessment of the Aerobic and Anaerobic Microfloras of Earthworm Guts and Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3): 1039–1044.
- Karsten, G.R., H.L. Drake, 1997. Denitrifying Bacteria in the Earthworm Gastrointestinal Tract and In Vivo Emission of Nitrous Oxide (N₂O) by Earthworms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(5): 1878–1882.
- Krištůfek, V., K. Ravasz, V. Pizl, 1992. Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.*, 24(12): 1499-1500.
- Krištůfek, V., K. Ravasz, V. Pizl, 1993. Actinomycete communities in earthworm guts and surrounding soil. *Pedobiologia*, 37: 379-384.
- Krištůfek, V., K. Ravasz, V. Pizl, 1994. Ultrastructural analysis of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoff. (Annelida, Lumbricidae). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41(3): 283-290.

- Krištůfek, V., V. Pizl, K. Ravasz, 1995. Epifluorescent Microscopy of earthworms' intestinal bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42(1): 39-44.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms, Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use.* Academic Press, Australia.
- López, Ferrer G.J., 2004. *Collibia sensu lato* of the Central and Western Regions of Puerto Rico: Biotechnological Capabilities, Characterization and Identification Using Traditional and Molecular Techniques. Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez.
- Margulis, L., J.Z. Jorgensen, S. Dolan, R. Kolchinsky, F.A. Rainey, S.C. Lo, 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 1236–1241.
- Márialigeti, K., 1979. On the community-structure of the gut-microbiota of *Eisenia lucens* (Annelida, Oligochaeta). *Pedobiologia*, 19: 213-220.
- Matthies, C., A. Griebhammer, M. Schmittroth, H.L. Drake, 1999. Evidence for Involvement of Gut-Associated Denitrifying Bacteria in Emission of Nitrous Oxide (N₂O) by Earthworms Obtained from Garden and Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8): 3599–3604.
- Meglitsch, P., F. Schram, 1991. *Invertebrate Zoology.* Oxford University Press, New York.
- Méndez, R., S. Borges, C. Betancourt, 2003. A microscopical view of the intestine of *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). *Pedobiologia*, 47: 900-903.
- Parle, J.N., 1963. Micro-organisms in the intestines of earthworms. *J. Gen. Microbiol.*, 31: 1-13.
- Polyanskaya, L.M., N.I. Babkina, G.M. Zenova, D.G. Zvyagintsev, 1996. Fate of Actinomycetes in the intestinal tract of soil invertebrates fed on *Streptomyces* spores. *Microbiology*, 65(4): 493-498.
- Rashed, H.A., I.M. Szabó, K. Dozsa-Farkas, 1992. On the composition of the intestinal microbiota of *Fridericia hegemon* (Enchytraeidae). *Soil Biol. Biochem.*, 24(12): 1291-1294.
- Santiago, A., 1995. Estudio de la flora bacteriana intestinal de *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) en Puerto Rico. Tesis M.S., Universidad de Puerto Rico, Mayagüez.

Shramm, A., K.S. Davidson, A.J. Dodsworth, H.L. Drake, D.A. Stahl, N. Dubilier, 2003. Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Env. Microb.*, 5(9): 804.

Singleton, D.R., P.F. Hendrix, D.C. Coleman, W.B. Whitman, 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae: Oligochaeta) *Soil Biol. Biochem.*, 35: 1547-1555.

Szabó, I.M., M. Marton, I. Butti, C. Fernández, 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.

Vilain, S., Y. Luo, M.B. Hildreth, V.S. Brözel, 2006. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7): 4970–4977.

ANEXO A.

PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA I

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin +/-	A3 β-Cyclodextrin +/-	A4 Dextrin +	A5 Glycogen +	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine +	A11 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose +/-	B5 D-Fructose +	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose +	B12 m-Inositol
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose +	C4 Maltotriose +	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose +	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D-Galactoside	C10 β-Methyl-D-Galactoside	C11 3-MethylGlucose +/-	C12 α-Methyl-D-Glucoside
D1 β-Methyl-D-Glucoside +	D2 α-Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose +	D4 D-Psicose +	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose +/-	D8 Salicin +/-	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose +
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose +	E3 Turanose +/-	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α-HydroxybutyricAcid +/-	E8 β-HydroxybutyricAcid	E9 γ-HydroxybutyricAcid	E10 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 α-KetoglutaricAcid	E12 α-Ketovaleric Acid +
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid +/-	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid +/-	F6 Pyruvatic AcidMethyl Ester +	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 PropionicAcid	F9 Pyruvic Acid +	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine +	G4 L-Alanyl-Glycine +	G5 L-Asparagine +	G6 L-Glutamic Acid +/-	G7 Glycyl- L-Glutamic Acid +	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine +	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol +
H1 Adenosine +	H2 2'-Deoxy Adenosine +	H3 Inosine +	H4 Thymidine +	H5 Uridine +	H6 Adenosine-5'-Monophosphate +	H7 Thymidine-5'-Monophosphate +	H8 Uridine-5'-Monophosphate +	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α-D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L-α-Glycerol Phosphate

ANEXO B.

PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA II

A1 Water	A2 α- Cyclodextrin	A3 β- Cyclodextrin	A4 Dextrin +/-	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D- Glucosamine +	A11 N-Acetyl-β-D- Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose	B12 m-Inositol
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D- Galactoside	C10 β-Methyl-D- Galactoside	C11 3-MethylGlucose	C12 α-Methyl-D- Glucoside
D1 β-Methyl-D- Glucoside	D2 α-Methyl-D- Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turánose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α- HydroxybutyricAcid	E8 β- HydroxybutyricAcid	E9 γ- HydroxybutyricAcid	E10 p-Hydroxy- Phenylacetic Acid	E11 α- KetoglutaricAcid	E12 α-Ketovaleric Acid
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic AcidMethyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 PropionicAcid	F9 Pyruvic Acid +	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L- Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine +/-	G4 L-Alanyl- Glycine +	G5 L- Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl- L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
H1 Adenosine +	H2 2'-Deoxy Adenosine +	H3 Inosine +	H4 Thymidine +	H5 Uridine +	H6 Adenosine-5'- Monophosphate +/-	H7 Thymidine-5'- Monophosphate +/-	H8 Uridine-5'- Monophosphate	H9 D-Fructose-6- Phosphate	H10 α-D-Glucose-1- Phosphate	H11 D-Glucose-6- Phosphate	H12 D-L-α- Glycerol Phosphate

ANEXO C.

PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA III

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 β-Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose	B12 m-Inositol
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D-Galactoside	C10 β-Methyl-D-Galactoside	C11 3-MethylGlucose	C12 α-Methyl-D-Glucoside
D1 β-Methyl-D-Glucoside	D2 α-Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turánose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid +	E7 α-HydroxybutyricAcid	E8 β-HydroxybutyricAcid	E9 γ-HydroxybutyricAcid	E10 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 α-KetoglutaricAcid	E12 α-Ketovaleric Acid +
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid +	F6 Pyruvic AcidMethyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 PropionicAcid	F9 Pyruvic Acid +	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine +/-	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid +	G7 Glycyl- L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol +
H1 Adenosine +	H2 2'-Deoxy Adenosine +	H3 Inosine +	H4 Thymidine +	H5 Uridine +	H6 Adenosine-5'-Monophosphate +/-	H7 Thymidine-5'-Monophosphate +	H8 Uridine-5'-Monophosphate +	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α-D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L-α-Glycerol Phosphate

ANEXO D.

PERFIL DE UTILIZACIÓN DE FUENTE DE CARBONO CEPA IV

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin +	A3 β-Cyclodextrin +	A4 Dextrin +	A5 Glycogen +	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine +	A11 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose -	B5 D-Fructose +	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose +	B12 m-Inositol
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose +	C4 Maltotriose +	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose +	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D-Galactoside	C10 β-Methyl-D-Galactoside	C11 3-MethylGlucose +	C12 α-Methyl-D-Glucoside
D1 β-Methyl-D-Glucoside +	D2 α-Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose +	D4 D-Psicose +	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose +/-	D8 Salicin +/-	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose +
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose +	E3 Turanose +/-	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α-HydroxybutyricAcid +/-	E8 β-HydroxybutyricAcid	E9 γ-HydroxybutyricAcid	E10 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 α-KetoglutaricAcid	E12 α-Ketovaleric Acid +
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid +/-	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid +/-	F6 Pyruvic AcidMethyl Ester +	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 PropionicAcid	F9 Pyruvic Acid +	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine +	G4 L-Alanyl-Glycine +	G5 L-Asparagine +	G6 L-Glutamic Acid +	G7 Glycyl- L-Glutamic Acid +	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine +	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol +
H1 Adenosine +	H2 2'-Deoxy Adenosine +	H3 Inosine +	H4 Thymidine +	H5 Uridine +	H6 Adenosine-5'-Monophosphate +	H7 Thymidine-5'-Monophosphate +	H8 Uridine-5'-Monophosphate +	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α-D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L-α-Glycerol Phosphate