



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

UNIDAD ACADÉMICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización de la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal de
Orthoporus ornatus y suelo en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa**

Tesis que presenta:

Biol. Claudia Patricia Avila Gaxiola

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas

Directores de tesis

Dra. Luz Isela Peinado Guevara

Dr. Ricardo Clark Tapia

Asesores de tesis

Dr. Samuel Campista León

M. en C. Yamel Guadalupe Rubio Rocha

Dr. Marcos Bucio Pacheco



Culiacán, Sinaloa, México, a enero de 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

Dedicada a todos los miriapodólogos que aportan desde diferentes áreas al conocimiento de estos
peculiares artrópodos.

Queda mucho por hacer.

AGRADECIMIENTOS

Como todo trabajo de investigación, y cualquier cosa en la vida, esto no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas otras personas. Y es por ello por lo que quiero agradecer aquí a algunas de ellas, con temor a quedarme corta.

Gracias a los miembros del comité de esta tesis, Dra. Luz Isela Peinado G., Dr. Samuel Campista L., al Dr. Ricardo Clark T., al Dr. Marcos Bucio P. y a la M.C. Yamel Rubio R. Sin el aporte y apoyo que proporcionaron el camino de realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a Oliver Sarabia y a Cecilia Soto, sin el apoyo técnico en el laboratorio y el apoyo moral durante todos esos días en los que los experimentos no salían o el estrés y la vida misma se hacían tormentosos, no sé cómo habría terminado todo.

Gracias a mi familia, que siempre ha apoyado cada paso que doy, con amor y comprensión. Gracias a mi mamá Claudia Gaxiola, por escucharme y alentarme, y a mis hermanas Ángeles María y Dulce Aurora, por abrazarme cuando más lo necesitaba, sin ustedes no sería lo que soy.

Gracias, a la persona con la que decidí compartir mi vida, Ángel Yonadab González. Por ayudarme cada vez que lo necesité, ya sea para escuchar mis frustraciones, buscar artículos que no podía encontrar, a estar ahí aún en la distancia; contigo siempre encuentro la solución a cualquier problema. Gracias a ti todo este proceso fue más llevadero.

A ustedes, GRACIAS.

Índice General

Resumen	xvii
Abstract.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Microbiota.....	3
2.2. Técnicas de estudio bacteriano	4
2.2.1 Cultivo bacteriano	4
2.2.2. Técnicas moleculares	4
2.2.2.1. Metagenómica	5
2.2.2.2. Secuenciación de Siguiete generación (NGS).....	6
2.3. Diplópodos.....	7
2.3.1. Diversidad e importancia de los milpiés en los ecosistemas.....	8
2.3.2. Importancia ecológica	11
2.3.3. Nicho ecológico.....	12
2.3.4. Identificación morfológica	12
2.3.5. Identificación molecular.....	14
2.3.6. Anatomía del tracto gastrointestinal.....	15
2.3.6.1. Intestino anterior.....	15
2.3.6.2. Intestino medio	16
2.3.6.3. Píloro e intestino posterior.....	16
2.3.7. Estudios sobre la microbiota de milpiés.....	17
2.4. Microbiota del suelo: Un ecosistema de alta diversidad.....	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV. JUSTIFICACIÓN.....	25
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS.....	27
6.1. Objetivo general.....	27
6.2. Objetivos específicos	27
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1. Lugar de recolección de los datos.....	29
7.2. Tipo de estudio.....	30
7.3. Muestra	30

7.3.1. Tamaño de la muestra	30
7.3.2. Tipo de muestreo.....	31
7.3.3. Criterios de inclusión	32
7.3.4. Criterios de exclusión.....	32
7.3.5. Criterios de eliminación	32
7.4. Metodología	32
7.4.1. Recolección de las muestras.....	32
7.4.2. Etiquetado de las muestras	33
7.4.3. Procesamiento de las muestras	33
7.4.4. Extracción de ADN y amplificación	35
7.4.5. Secuenciación.....	36
7.4.6. Análisis bioinformático y estadístico	36
7.4.7. Diversidad en México	38
7.5. Lugar de realización.....	38
7.6. Financiamiento.....	38
VIII. RESULTADOS	39
8.1. Muestreo	39
8.2. Análisis de suelo	40
8.3. Identificación de milpiés.....	40
8.4. Cuantificación del ADN extraído	41
8.5. Secuenciación	42
8.6. Análisis de calidad de las lecturas	44
8.7. Composición por muestra en intestino de milpiés	45
8.7.1. Especies bacterianas identificadas en intestino de milpiés	48
8.8. Composición bacteriana por muestra de suelo.....	48
8.8.1. Especies bacterianas identificadas en suelo	51
8.9. Diversidad entre milpiés y suelo.....	52
8.10. Análisis estadístico	58
8.11. Diversidad con números de Hill	58
IX. DISCUSIÓN.....	61
X. CONCLUSIONES.....	70
XI. PERSPECTIVAS	72
XII. REFERENCIAS.....	73
XIII. ANEXOS	85

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Bacterias encontradas en el intestino de diferentes especies de milpiés...	20
2	Muestras de milpiés y sus respectivas muestras de suelo a los que se les extrajo ADN.....	31
3	Condiciones de PCR que se utilizaron para extracción de ARNr 16S.....	36
4	Datos de colecta de los especímenes.....	39
5	Cationes y aniones solubles en suelo.....	40
6	Resultados de cuantificación de cada muestra.....	42
7	Análisis de calidad de la corrida.....	43
8	Muestras resencuenciadas.....	44

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Diversidad de milpiés descritos para el mundo, México y Sinaloa.....	10
2	Anatomía externa de un milpiés.....	13
3	Anatomía del tracto gastrointestinal de un milpiés.....	15
4	Análisis de las bacterias que se encuentran en diferentes tipos de suelo.....	23
5	Diagrama experimental.....	28
6	Ubicación del lugar de muestreo en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa, México.....	30
7	Estructuras anatómicas claves para la identificación de los milpiés, vista en microscopio estereoscópico de un <i>O. ornatus</i> adulto macho.....	41
8	Resultado de la calidad de secuencia por base de la muestra L1M2D1.....	44
9	Grupos bacterianos más representativos en el intestino de milpiés.....	45
10	Grupos bacterianos (filos) encontrados en cada muestra de intestino de milpiés.....	47
11	Filos bacterianos más representativos en las muestras de suelo.....	49
12	Filos bacterianos presentes en muestras de suelo.....	51
13	Mapa de calor para muestras de suelo e intestino de milpiés, agrupado jerárquicamente a nivel de filos con abundancias mayores al 1%.	53
14	Filos bacterianos presentes en las muestras M7S1 y M7D1.....	54
15	Filos bacterianos presentes en las muestras M9S1 y M9D1.....	55
16	Filos bacterianos presentes en las muestras M12S1 y M12D1.....	55
17	Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2D1 y L1M2S1.....	56

18	Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2S4 y L1MD4.....	56
19	Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2S5 y L1M2D5.....	57
20	Análisis de Coordenadas Principales de muestras secuenciadas.....	58
21	Resultados del PERMANOVA.....	58
22	Diversidad de especies a nivel de familia entre muestras de suelo y Diplopoda.....	59
23	Curvas de interpolación/extrapolación de la diversidad promedio de especies en muestras de suelo y Diplopoda, con base en los números de Hill.....	60
24	Análisis de la cobertura de la muestra basado en el número de OTUs recolectados en muestras de suelo y Diplopoda.....	60

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosomal

CIAD: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

DGGE: Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante

ETC: Etcétera

FG: Foregut o intestino anterior

GBIF: Sistema Global de Información sobre Biodiversidad

HG: Hindgut o intestino posterior

MG: Miidgut o intestino medio

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

OTUs: Unidades Taxonómicas Operativas

PCoA: Análisis de Coordenadas Principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SMS: Shot Metagenomics Sequencing

WGS: Whole Genome Sequencing

Resumen

Introducción: El estudio del microbioma ambiental ha ido en aumento ya que se está reconociendo su importancia en muchos aspectos biológicos; resultan de especial interés la microbiota bacteriana del suelo y la microbiota intestinal de artrópodos edáficos, así como la relación microbiana entre estos dos hábitats. Los milpiés son animales edáficos con un importante papel en la degradación de materia orgánica de diversos ecosistemas, pertenecen al subfilo Myriapoda y son de distribución casi cosmopolita (no habitan la Antártida). Aunque tienen una importante relación con las bacterias del suelo, pudiéndose ayudar de éstas para realizar la degradación enzimática, son muy pocos los trabajos donde se toma a los milpiés como modelo biológico. Es por ello que el **objetivo** de este trabajo fue caracterizar la microbiota del tracto gastrointestinal de milpiés y del suelo donde fueron recolectados, en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa. **Metodología:** En este trabajo se recolectaron 13 individuos de *Orthoporus ornatus* con sus respectivas muestras de suelo, con las cuales se llevó a cabo el análisis metagenómico mediante secuenciación paired-end en la plataforma Illumina. **Resultados:** Se encontró que, en las muestras procedentes de intestino de milpiés, los filos más abundantes fueron Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, y en las muestras procedentes de suelo predominó el filo Proteobacteria, seguido de Actinobacteria, Acidobacteria y Firmicutes. El análisis estadístico arrojó que existen diferencias significativas ($p=0.001$) entre estos dos grupos de muestras (suelo e intestino de milpiés). **Conclusión:** La microbiota bacteriana muestra una composición diversa y específica entre milpiés y suelo, reflejando una adaptación ecológica distintiva y una interacción compleja entre organismo y ambiente.

Palabras clave: Diplopoda, Spirostreptida, metagenómica, microbiota intestinal, suelo.

Abstract

Introduction: The study of the environmental microbiome has been increasing as its importance in many biological aspects is being recognized; of special interest are the soil bacterial microbiota and the intestinal microbiota of edaphic arthropods, as well as the microbial relationship between these two habitats. Millipedes are edaphic animals with an important role in the degradation of organic matter in diverse ecosystems, they belong to the subfilum Myriapoda and are almost cosmopolitan in distribution (they do not inhabit Antarctica). Although they have an important relationship with soil bacteria, being able to help them to perform enzymatic degradation, there are very few works where millipedes are taken as a biological model. For this reason, the **objective** of this work was to characterize the microbiota of the gastrointestinal tract of millipedes and the soil where they were collected in El Carmen, San Ignacio, Sinaloa.

Methodology: In this work, 13 individuals of *Orthoporus ornatus* were collected with their respective soil samples, with which metagenomic analysis was carried out by paired-end sequencing in the Illumina platform. **Results:** It was found that in the millipede gut samples, the most abundant phyla were Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria, and in the soil samples the phylum Proteobacteria predominated, followed by Actinobacteria, Acidobacteria and Firmicutes. Statistical analysis showed that there are significant differences ($p=0.001$) between these two groups of samples (soil and millipede intestine). **Conclusion:** The bacterial microbiota shows a diverse and specific composition between millipedes and soil, reflecting a distinctive ecological adaptation and a complex interaction between organism and environment.

Key words: Diplopoda, Spirostreptida, metagenomics, gut microbiota, soil.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro del intestino de los artrópodos, se ha descubierto una notable diversidad de microorganismos, que incluye bacterias, arqueas, hongos y nemátodos. Entre estos invertebrados se encuentran los diplópodos, comúnmente conocidos como milpiés, que pertenecen al subfilo Myriapoda y desempeñan un papel fundamental como detritívoros. Su importancia ecológica en suelos radica en su capacidad para descomponer la materia orgánica presente en diversos hábitats, convirtiéndolos en elementos cruciales en muchos de los ecosistemas en los que habitan (Knapp et al., 2010).

Dentro del intestino de milpiés las bacterias son los microorganismos que tienen un papel clave, siendo las principales contribuidoras en la degradación de polisacáridos y fermentación (Nardi et al., 2016). Entre los filos dominantes en la microbiota intestinal destacan Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Escherichia* y *Vibrio* son géneros bacterianos que se encuentran en el tracto gastrointestinal de diplópodos (Byzov, 2006; Geli-Cruz, 2019; Kitagami et al., 2019).

El trabajo pionero de Taylor (1982) fue uno de los primeros estudios en identificar bacterias en el intestino de la especie *Orthoporus ornatus*. Este estudio reveló que las bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Bacillus* eran las más abundantes. Sin embargo, es importante destacar que en este estudio se utilizaron técnicas de cultivo, lo que limitó la detección de ciertas especies bacterianas debido a que no todas eran cultivadas. Esta limitación se ha superado con el advenimiento de técnicas más avanzadas de identificación bacteriana, como la Secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés).

A pesar de su relevancia ecológica, es sorprendente la escasa atención que se ha prestado a los milpiés en relación con su microbiota intestinal, es decir, la comunidad de microorganismos que coloniza su tracto gastrointestinal. Algunos estudios se han centrado en la producción de metano, que resulta de la descomposición de la materia orgánica, y se ha sugerido que esta producción está vinculada a la interacción con bacterias y arqueas metanógenas. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha llevado a cabo un análisis comparativo entre la microbiota intestinal de los milpiés y el microbioma presente en el suelo, a pesar de la importancia que esto podría tener (Sustr et al., 2020).

La NGS ha revolucionado la investigación en microbiología al proporcionar una visión más completa y detallada de las comunidades microbianas. Entre las plataformas de secuenciación disponibles actualmente, como 454, SOLiD, Ion Torrent y PacBio, la más utilizada es Illumina, debido a su costo reducido y baja tasa de errores asociada (Levy y Boone, 2019). Esta plataforma fue seleccionada para llevar a cabo la presente investigación.

En este trabajo se formuló la hipótesis de que la microbiota presente en el intestino de los milpiés difiere estadísticamente de manera significativa de la que se encuentra en las muestras de suelo en las que estos artrópodos habitan. Además, se espera que el filo más abundante en ambas comunidades sea Proteobacteria.

El objetivo principal es caracterizar las bacterias asociadas a la microbiota intestinal de los milpiés y compararlas con las que residen en el suelo que habitan. A través de este enfoque, se busca realizar estimaciones precisas de la diversidad y abundancia de los diferentes grupos taxonómicos de bacterias presentes en estos dos ambientes.

II. ANTECEDENTES

2.1. Microbiota

La microbiota, un término acuñado por Joshua Lederberg en 2001, se refiere a la comunidad de microorganismos que reside en un nicho ecológico específico, mientras que el microbioma abarca tanto a estos microorganismos como sus genes y metabolitos dentro de dicho nicho (Sebastián-Domingo y Sánchez-Sánchez, 2018).

En las últimas décadas, el conocimiento acerca de las comunidades microbianas, incluida la microbiota intestinal, ha experimentado un significativo aumento gracias al enfoque de la metagenómica, especialmente a través del método de shotgun (Esposti y Romero, 2017). De manera particular, la microbiota intestinal se encuentra entre las más estudiadas debido a su influencia en la salud y el bienestar de los hospederos. Sus actividades metabólicas tienen un potencial impacto en la modulación de procesos inflamatorios y la permeabilidad intestinal (Dahl et al., 2020). Este enfoque ha emergido como un campo prometedor, contribuyendo a una mejor comprensión de las dinámicas ecológicas que existen entre los organismos hospederos (Romero et al., 2019).

Los microorganismos que componen la microbiota intestinal desempeñan una amplia variedad de funciones de vital importancia para el metabolismo y la supervivencia de sus hospederos. Estas funciones van desde la digestión de carbohidratos complejos hasta su papel en la regulación de la respuesta del sistema inmunológico. En última instancia, las comunidades microbianas presentes en el tracto gastrointestinal se han convertido en un componente esencial para el funcionamiento adecuado de numerosos organismos hospederos (Romero et al., 2019).

2.2. Técnicas de estudio bacteriano

2.2.1 Cultivo bacteriano

Los primeros estudios de diversidad microbiana a partir de muestras ambientales se basaron en gran medida en técnicas de cultivo bacteriano, lo que limitaba la capacidad de estudio a los microorganismos que podían ser aislados (Cortés-López et al., 2020). Durante siglos, los microbiólogos dependieron en gran medida de este enfoque para investigar los microorganismos, sentando así las bases de la microbiología y la identificación de patógenos de importancia para la salud humana. Sin embargo, se reveló una discrepancia significativa entre las células microbianas observadas bajo el microscopio y el número de Unidades Formadoras de Colonias que crecían en agar a partir de la misma muestra, lo que se conoció como la "anomalía de conteo en placa". Más tarde, con el surgimiento de la taxonomía molecular, se descubrió que muchas bacterias eran difíciles o incluso imposibles de cultivar en medios convencionales, lo que llevó al descubrimiento de una gran cantidad de bacterias nuevas para la ciencia (Sommer, 2015).

2.2.2. Técnicas moleculares

El estudio de las comunidades bacterianas basado en secuenciación ha planteado uno de los mayores desafíos en el campo de la ecología microbiana (Sevim et al., 2019).

Los genes de ARN ribosomal, en particular el ARNr 16S, se han convertido en una herramienta fundamental para la clasificación taxonómica de los organismos procariotas. Estos genes son altamente conservados, evolutivamente estables y contienen regiones hipervariables que permiten la diferenciación entre diferentes grupos microbianos. El uso de estos genes ha dado lugar a la creación de extensas bases de datos que contienen información de una amplia variedad de organismos (Cortés-López et al., 2020).

La metagenómica, como una rama de las ciencias genómicas, ha surgido como una metodología revolucionaria en el estudio de la diversidad microbiana a nivel molecular. A través de la metagenómica, se ha logrado avanzar en la enumeración y caracterización de esta diversidad en muestras ambientales previamente desconocidas (Sommer, 2015).

2.2.2.1. Metagenómica

El término "metagenoma" se refiere al conjunto completo de material genético presente en una muestra ambiental. La metagenómica se basa en técnicas moleculares para analizar la diversidad genómica de los microorganismos (Sebastián-Domingo y Sánchez-Sánchez). Una herramienta crucial en la metagenómica es la secuenciación del gen ARNr 16S, un polirribonucleótido que consta de aproximadamente 1,500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs* y ampliamente utilizado como marcador molecular para la clasificación taxonómica de bacterias y arqueas (Rodicio y Mendoza, 2004). Este gen presenta regiones conservadas y variables que permiten la diferenciación de diversas taxonomías microbianas, y su amplia disponibilidad en bases de datos, como GreenGenes, ha facilitado su aplicación (Mantilla-Martínez y Torres-Sáez, 2019). La ventaja del ARNr 16S radica en su capacidad para identificar microorganismos hasta el nivel de género, gracias a la abundancia de información disponible. Hasta el 2012, se habían generado más de 3.5 millones de secuencias utilizando esta técnica (Quas et al., 2012).

Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las bacterias que colonizan nichos ecológicos específicos son tan especializadas en sus condiciones que su cultivo en medios de laboratorio es extremadamente difícil e, incluso, en ocasiones, imposible. Esto ha llevado a la identificación de un gran número de microorganismos que no pueden ser cultivados mediante técnicas convencionales. Por lo tanto, la microbiología tradicional no puede proporcionar

identificaciones a nivel de especie y limita la comprensión de la diversidad microbiana en su totalidad (Ortega-Avila, 2014).

2.2.2.2. Secuenciación de Siguiete generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (NGS, Next Generation Sequencing) ha revolucionado la microbiología al permitir la secuenciación simultánea de millones de moléculas de ADN. Entre las plataformas de NGS, la pirosecuenciación 454, que genera secuencias de hasta 1,200 pb (pares de bases), destacó inicialmente, pero tenía una tasa de error relativamente alta de 1% y costos más elevados (Cortés-López et al., 2020).

Posteriormente, la secuenciación de segunda generación, representada por la plataforma Illumina, produce lecturas cortas de 50 a 400 pb y se ha convertido en una de las secuenciaciones más utilizadas debido a su menor costo y una tasa de error de aproximadamente 0.1%. Sin embargo, su uso efectivo requiere un sólido conocimiento de bioinformática (Cortés-López et al., 2020).

En algunos casos, la amplificación previa mediante PCR del gen ARNr 16S se utiliza antes de aplicar la secuenciación masiva, lo que permite la identificación de microorganismos hasta el nivel de género. Sin embargo, esta técnica introduce un sesgo hacia las especies más abundantes y puede limitar la detección de microorganismos en menor proporción (Cortés-López et al., 2020).

Una alternativa prometedora para lograr la identificación a nivel taxonómico por debajo del género es la secuenciación masiva de genomas completos, conocida como "Whole Genome Shotgun Sequencing" (WGS) y "Shot Metagenomics Sequencing" (SMS). Estas técnicas permiten la secuenciación de todo el genoma y no requieren amplificación previa mediante

PCR. Sin embargo, aún presentan desafíos en términos de costos y análisis bioinformáticos más complejos (Cortés-López et al., 2020).

El análisis de datos generados a través de estas técnicas requiere herramientas bioinformáticas, como MOTHUR y QIIME, que permiten estimar la diversidad microbiana utilizando índices como Chao, Shannon y Simpson (Mantilla-Martínez y Torres-Sáez, 2019).

Estas técnicas han transformado la comprensión de la diversidad microbiana, permitiéndonos explorar y caracterizar comunidades microbianas enteras, incluidos microorganismos que antes eran inaccesibles mediante el cultivo tradicional.

2.3. Diplópodos

La clase Diplopoda alberga una asombrosa diversidad de especies, con alrededor de 15,797 especies descritas y una estimación que sugiere la existencia de hasta 80,000 especies en total (Pitz y Sierwald, 2010; López-Bonel, 2021). A pesar de su antigüedad evolutiva, ya que se remontan al Silúrico, y su impresionante diversidad taxonómica (Golovatch y Liu, 2020), los diplópodos son uno de los grupos de artrópodos menos explorados por la ciencia.

Estos artrópodos, comúnmente conocidos como milpiés, presentan una microbiota intestinal específica que difiere significativamente de las comunidades microbianas presentes en el suelo y la hojarasca. El interés científico por los milpiés radica en gran medida en su participación en ciclos de nutrientes del suelo, especialmente en el ciclo del carbono. Estos procesos son mediados por la fragmentación de la hojarasca y la deposición de sedimentos fecales por parte de los milpiés. La mayoría de los estudios en este campo han empleado el método de placa de dilución (Byzov, 2006), aunque existe una creciente sugerencia de utilizar análisis metagenómicos, que permiten identificar microorganismos que podrían pasar desapercibidos mediante métodos convencionales (Geli-Cruz, 2019).

A pesar de su importancia ecológica, aún se desconoce en gran medida la función exacta de los microorganismos intestinales en los milpiés. Existen indicios indirectos de que esta microbiota desempeña un papel en los procesos de digestión enzimática llevados a cabo por estos artrópodos (Tajovsky, 1992). Se sabe que los milpiés regulan la abundancia de microorganismos en el suelo y también alteran las comunidades microbianas al eliminar ciertos microorganismos y favorecer el crecimiento de otros. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo ocurre esto aún no se comprende completamente (Byzov, 2006).

Se han propuesto varias funciones posibles para los microorganismos intestinales de los milpiés, que incluyen su participación en los procesos digestivos y la producción de metano. Se presume que los milpiés no albergan microorganismos que degraden específicamente la lignocelulosa, sino que se alimentan de microorganismos y utilizan enzimas microbianas para descomponer estas moléculas (Byzov, 2006).

2.3.1. Diversidad e importancia de los milpiés en los ecosistemas

La distribución de los milpiés se caracteriza por rangos geográficos bastante reducidos, ya que su capacidad de dispersión es limitada y sus nichos ecológicos son altamente especializados (Golovatch y Liu, 2020). Uno de los principales factores que influyen en su distribución es la humedad, por lo que se encuentran con mayor frecuencia en hábitats húmedos, especialmente durante la temporada de lluvias y en horarios nocturnos. Aunque los milpiés se distribuyen en la mayoría de los continentes, no se han registrado en la Antártida, la mayor parte de Groenlandia y una parte importante del Sahara Occidental (López-Bonel, 2021).

La temperatura también desempeña un papel crucial en la distribución de los milpiés, ya que prefieren temperaturas templadas, en el rango de 20 a 25 °C, lo que también afecta su desarrollo embrionario, siendo más rápido a temperaturas más elevadas (Alagesan y Muthukrishnan, 2003). Sin embargo, algunas especies, como *Orthoporus ornatus*, permanecen en estado de

letargo durante los períodos secos que pueden durar hasta 8 meses. Aumentar la temperatura en su hábitat prolongaría este letargo, agotando sus reservas metabólicas antes de que las condiciones sean propicias para emerger (David, 2009).

La calidad del alimento es otro factor clave en la distribución de los milpiés, ya que prefieren la materia vegetal en descomposición con un alto contenido de nitrógeno, lo que influye en su crecimiento y reproducción. Además, la cobertura del suelo también afecta su elección de hábitat, con algunas especies prefiriendo bosques, pastizales o mezclas de hábitats. Los bosques, en particular, albergan una mayor especialización de especies y una mayor diversidad microambiental (David, 2009).

Todos estos factores contribuyen a la distribución diversificada de las numerosas especies de milpiés en todo el mundo, con un impresionante registro de aproximadamente 15,797 especies descritas hasta la fecha (Figura 1).

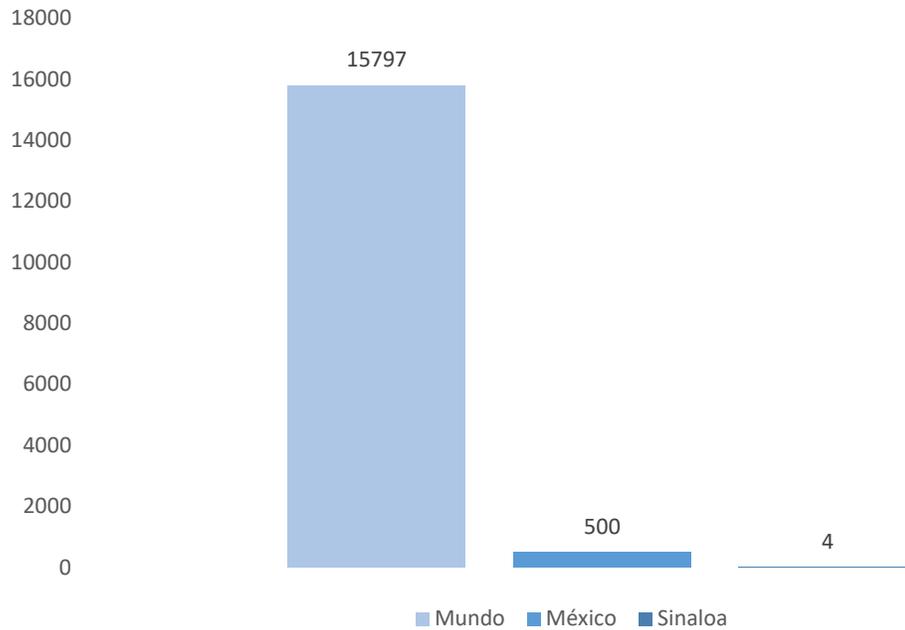


Figura 1. Diversidad de milpiés descritos para el mundo, México y Sinaloa (López-Bonel, 2021).

En el contexto de México, se ha documentado una rica diversidad de milpiés, con aproximadamente 500 especies registradas (Cupul-Magaña, 2014). Sin embargo, al realizar una revisión de la literatura específica para el estado de Sinaloa, se constata que solo se han registrado cuatro especies de milpiés en esta región. Estas especies son *Asiomorpha coarctata*, *Oxidus gracilis*, *Aspidiophon divisum* y *Choixulus valdezi*, siendo notable que las dos últimas se consideran endémicas de Sinaloa (Lopez-Bonel, 2021; Cupul-Magaña, 2015). Esta limitada diversidad de milpiés documentada en Sinaloa resalta la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor la distribución y la ecología de estas especies en esta región.

2.3.2. Importancia ecológica

Los diplópodos desempeñan un papel crucial en la ecología del suelo como invertebrados esenciales. Cumplen la valiosa función de descomponedores, compitiendo principalmente con las lombrices y las termitas en este ecosistema. A través de su actividad, contribuyen al enriquecimiento de los suelos al liberar compuestos como amoníaco y ácido úrico, que, al degradarse, aportan nitratos esenciales para la fertilidad del suelo (de Godoy y Fontanetti, 2010; Knapp et al., 2009).

La descomposición de la materia orgánica vegetal es un proceso biogeoquímico fundamental en todos los ecosistemas terrestres, y ocurre principalmente a través de tres procesos: lixiviación de compuestos solubles en agua, degradación mediada por microorganismos del suelo y procesamiento por parte de los animales detritívoros del suelo, como los milpiés. Las dos primeras son las que principalmente se estudian, dando poca importancia a los animales invertebrados del suelo que ayudan también a completar estos ciclos biogeoquímicos. La conversión del detrito a heces detritívoras incrementa la calidad y la descomposición de elementos recalcitrantes y materia de descomposición lenta, haciendo más fácil la descomposición (Joey et al., 2020).

Además, debido a que ciertos factores ambientales pueden inducir cambios fisiológicos en los tejidos de estos organismos, se ha propuesto a los diplópodos como bioindicadores en estudios relacionados con la calidad del suelo (Dunger y Voigtländer, 2009). Su presencia o ausencia y la composición de las especies de milpiés pueden ofrecer pistas valiosas sobre la salud y la recuperación de hábitats, especialmente en áreas afectadas por la contaminación, como sitios mineros. El estudio de la sucesión ecológica de diferentes especies de milpiés puede ser de particular relevancia en la evaluación de la recuperación de estos ecosistemas (de Godoy y Fontanetti, 2010).

2.3.3. Nicho ecológico

El concepto de nicho ecológico es fundamental en la ecología y está intrínsecamente relacionado con la conservación de las especies (Karsiewics et al., 2017). Se descompone en dos componentes interrelacionados: el "hipervolumen n-dimensional", que define el espacio multidimensional dentro del cual una población de una especie puede persistir, sobrevivir y reproducirse; y la "proporción real de persistencia", que se refiere a la proporción en la que una especie en realidad persiste en un conjunto de factores abióticos e interacciones biológicas específicas (Karsiewics et al., 2017).

La definición precisa de un nicho ecológico no se puede alcanzar solo a través de la observación superficial; en cambio, requiere una exhaustiva investigación de los requerimientos fisiológicos de las especies y de cómo interactúan con su entorno (Karsiewics et al., 2017).

En comunidades con muchas especies raras, como puede ser la diversidad de artrópodos en los trópicos o las comunidades microbianas que se encuentran en el suelo, es posible que se observe que la riqueza de la muestra nunca llegue a estabilizarse aun cuando se aumente el tamaño de la muestra. Para poder controlar un poco este sesgo, los ecólogos usan la rarefacción, pero además se necesita comparar muestras que tengan igual integridad entre sí, sin importar el tamaño de la muestra. Cuando se realizan curvas de rarefacción y extrapolación se obtienen comparaciones más justas entre muestras de cualquier tamaño (Chao y Jost, 2012).

2.3.4. Identificación morfológica

La característica distintiva que permite la clasificación de un organismo en la clase Diplopoda es la presencia de dos pares de patas por segmento corporal, excepto en los segmentos anteriores (Ribera et al., 2015). Los adultos pueden variar en tamaño desde 1.4 mm hasta 30 cm. Presentan una cutícula que rara vez se endurece y está cubierta por setas modificadas en algunas especies,

aunque en otras puede ser calcificada, formando un exoesqueleto inflexible. Sin embargo, en casos excepcionales, como en los géneros *Glomeridesmida* y *Polyzoniida*, este exoesqueleto puede ser flexible (Brewer, 2013). La anatomía general de un diplópodo consta de cabeza, tronco y telson (Bueno-Villegas et al., 2004).

Estos aspectos morfológicos son esenciales para la identificación y clasificación de los diplópodos en esta clase. La observación y el análisis detallado de estas características permiten a los científicos distinguir y catalogar las diferentes especies dentro de esta diversa clase de artrópodos (Ribera et al., 2015; Brewer, 2013; Bueno-Villegas et al., 2004).

Además, es importante destacar que la presencia de ommatidia, estructuras relacionadas con la visión, varía entre órdenes, siendo ausentes en algunos, como *Glomeridesmida*, *Platydesmida*, *Siphonophorida* y *Polydesmida* (Brewer, 2013).

Un rasgo distintivo clave para la diferenciación entre especies de milpiés es el aparato reproductor masculino, conocido como gonópodos o gonopodio (Figura 2) (Brewer, 2013).

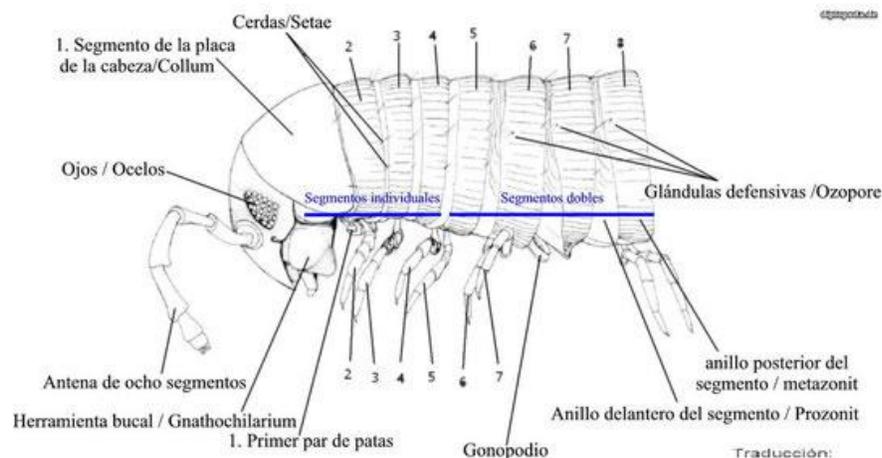


Figura 2. Anatomía externa de un milpiés (Imagen tomada de <https://www.artroposfera.com>).

2.3.5. Identificación molecular

En el ámbito de la sistemática, los genes de ARN ribosomal 18S y 28S han adquirido una destacada notoriedad como marcadores moleculares en estudios filogenéticos. En años recientes, se han empleado análisis combinados de estos dos genes para abordar problemas sistémicos profundos, incluyendo la filogenia de diversos grupos de artrópodos (Cong et al., 2009). Además, se ha llevado a cabo un diagnóstico molecular utilizando el gen ARNr 28S para diferenciar dos especies de Chilopodos, *Craterostigma tasmanius* y *Craterostigma Crabilli* (Velez et al., 2012).

Otros genes, de origen mitocondrial, como el ARNr 16S, junto con el gen COI, se han empleado para investigar las estructuras poblacionales de los ciempiés, y se han desarrollado oligos universales específicos para este gen en artrópodos (Folmer et al., 1994).

A pesar de que tradicionalmente se ha considerado que las características de la genitalia son útiles para la identificación a nivel de especies en numerosos artrópodos, incluyendo los milpiés, la abundante información molecular generada en la última década ha demostrado que las características genitales y otras características morfológicas son más pragmáticas que representativas de la diversidad evolutiva. Esto se debe en gran medida a la existencia de numerosas especies crípticas. En este contexto, Decker (2016) propone una revisión exhaustiva del taxón, incorporando enfoques tanto moleculares como morfológicos.

El uso de secuencias de ADN para distinguir entre taxones, identificar especies y estimar filogenias se ha vuelto prominente en la sistemática de invertebrados. Los datos moleculares proporcionan una fuente esencial de información para abordar las preguntas sobre variabilidad morfológica que han planteado desafíos en la taxonomía de los miriápodos, cuyas especies en

su mayoría se han caracterizado basándose en la revisión de un número limitado de ejemplares (Edgecombe y Giribet, 2009).

2.3.6. Anatomía del tracto gastrointestinal

En lo que respecta a la anatomía del intestino de los milpiés, se observa una división en tres partes claramente definidas (Figura 3): el intestino anterior (FG), el intestino medio (MG) y el intestino posterior (HG).

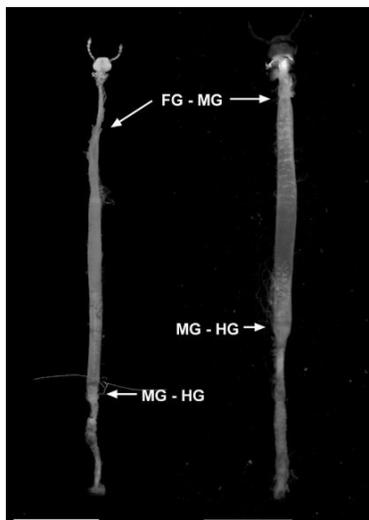


Figura 3. Anatomía del tracto gastrointestinal de un milpiés. Escala=5.0 mm (Nardi et al., 2016).

2.3.6.1. Intestino anterior

El intestino anterior se presenta como un tubo delgado y amarillento, con un diámetro uniforme hasta llegar a la transición hacia el intestino medio. En comparación con las otras porciones del intestino, esta región contiene una cantidad reducida de alimento. En el extremo posterior, se localiza una válvula esofágica que se presume regula el flujo de alimento hacia la parte del intestino medio (Nunez y Crawford, 1977; Taylor, 1982).

2.3.6.2. Intestino medio

El intestino medio se distingue externamente por su característico color ocre. Internamente, se encuentra una membrana, llamada peritrófica, que recubre el contenido (Nunez y Crawford, 1977).

2.3.6.3. Píloro e intestino posterior

Entre la unión del intestino medio y el posterior, se encuentra una sección denominada válvula pilórica, que se observa de color blanquecino y presenta pliegues musculares anchos. La porción del intestino posterior se muestra de un tono marrón y puede representar hasta la mitad de la longitud total del tracto intestinal, dependiendo de la cantidad de alimento consumido. En casos extremos, puede ocupar todo el espacio disponible en esta parte dentro de la cavidad del animal (Nunez y Crawford, 1977). La parte externa del intestino posterior está cubierta por una cutícula que se desprende junto con el exoesqueleto en cada muda del animal (Nardi et al., 2002).

Es importante señalar que los milpiés representan una excepción en la anatomía típica de los artrópodos productores de metano, ya que su intestino posterior carece de la bolsa agrandada que es característica en otros invertebrados metanógenos (Sustr et al., 2020). Además, se observa una diferencia en el tamaño del intestino en comparación con insectos como termitas, grillos o escarabajos, que suelen tener intestinos más largos que sus cuerpos, característica que no se encuentra en los milpiés, como se muestra en la Figura 3 (Nardi et al., 2016). Con la excepción de las glándulas salivales, no se han identificado glándulas que secreten enzimas para la digestión de alimentos, a diferencia de otros artrópodos (Nunez y Crawford, 1977).

En el caso particular de los milpiés del desierto (*Orthoporus ornatus*), la cutícula del intestino posterior forma numerosas proyecciones en las que se presume que residen bacterias. Los

ensayos enzimáticos han indicado que la mayor parte de la degradación de la celulosa y la hemicelulosa ocurre en el intestino medio, mientras que el intestino posterior desempeña un papel importante en la degradación de la pectina (Kitagami et al., 2019). En cada una de las tres secciones del intestino, se han detectado microorganismos que forman parte de la microbiota (Kitagami et al., 2019).

2.3.7. Estudios sobre la microbiota de milpiés

Dentro de cada una de las tres secciones del intestino, se han encontrado microorganismos que forman parte de la llamada microbiota (Kitagami et al., 2019). De manera particular, la investigación sobre la microbiota asociada al intestino de los milpiés ha revelado la presencia de diversos microorganismos, incluyendo hongos tricomicetos, bacterias, arqueas y virus, en la región media o posterior del intestino; dentro de estos microorganismos, las bacterias han demostrado ser los principales contribuidores de procesos como la degradación de polisacáridos, la síntesis de aminoácidos, el metabolismo de ácidos grasos de cadena corta y en la fermentación (Nardi et al., 2016; Angel et al., 2023). Llegando a representar hasta un 92.7% de las funciones totales del microbioma (Sardar et al., 2022).

El grupo de milpiés más ampliamente estudiado en términos de microbiota ha sido el orden Juliformes, con un enfoque particular en la producción de metano en el intestino posterior (Horvathova et al., 2021). Dentro de este contexto, Horvathova et al. (2021) han identificado que el acetato es el principal producto de fermentación en el intestino posterior de estos milpiés.

Entre las bacterias predominantes halladas en el intestino de los milpiés, se encuentran bacterias anaerobias facultativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Escherichia*, además de bacterias

de la familia Vibrionaceae, como el género *Vibrio* (Byzov, 2006). Sin embargo, un estudio llevado a cabo por Kitagami et al. (2019) han identificado a Firmicutes y Proteobacterias como las más abundantes, con el respaldo de Geli-Cruz et al. (2019), quienes también han añadido a Bacteroidetes como parte representativa de la comunidad microbiana en la especie de milpiés *Anadenobolus monilicornis* (Cuadro 1).

Los hallazgos de Taylor (1982) han sugerido que los procesos de degradación enzimática de la celulosa son atribuibles a microorganismos presentes en el intestino de *Orthoporus ornatus* y la especie *Comanchelus* sp. Esto sugiere que este fenómeno podría estar presente en todos los milpiés, especialmente en aquellos que habitan en zonas desérticas, donde la disponibilidad de alimento podría ser limitada. Además, en estos casos, proporcionarían a las bacterias un entorno rico en sustratos. Este concepto se respalda con el trabajo de Koubová et al. (2023) quienes aislaron y secuenciaron bacterias con potencial actividad celulolítica.

Jarosz y Kania (2000) llevaron a cabo un estudio utilizando técnicas tradicionales de cultivo y concluyeron que las especies bacterianas más frecuentemente encontradas eran *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* y *Klebsiella* sp. Adicionalmente, en un estudio en el que se empleó la técnica de Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) analizaron si cambios en la dieta de la especie *Cilindroiulus fulviceps* afectaba drásticamente las comunidades microbianas, bajo el supuesto de que los milpiés mantienen una microbiota estable. Sus resultados revelaron que Enterobacteriaceae constituía el 45% del total de especies identificadas, siendo el género *Budvicia* el más abundante. Este estudio sugiere que los milpiés mantienen una microbiota característica que difiere tanto del sustrato en el que se encuentran como del alimento que consumen (Knapp et al., 2009).

En los estudios que han comparado la microbiota en las tres partes del intestino, se destaca el trabajo de Cazemier et al. (1997), quienes emplearon técnicas de microscopia y tinción DAPI. Este estudio obtuvo resultados de 1.7, 1.4 y 15×10^9 células/mL en el intestino anterior, medio y posterior, respectivamente, de la especie *Chicobolus* sp.

A pesar de que se han realizado investigaciones sobre la microbiota intestinal en los diplópodos, hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios que establezcan directamente la relación entre los microorganismos presentes en el suelo y la microbiota de los milpiés.

Cuadro 1. Bacterias encontradas en el intestino de diferentes especies de milpiés.

Hospedero	Bacteria(s) encontrada(s)	Método de identificación bacteriana	Objetivo	Referencia
<i>Orthoporus ornatus</i> y <i>Comanchelus</i> sp.	Firmicutes (<i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i>)	Cultivo		(Taylor, 1982) en EUA
<i>Ommatoiulus sabulosus</i> (Julida)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Sarcina</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	Cultivo bacteriano		(Jarosz y Kania, 2000) en Polonia
<i>Cilindroiulus fulviceps</i> (Julida)	Enterobacteriaceae	DGGE		(Knapp et al., 2009) en Austria
<i>Cambala speobia</i> (Spirostreptida) y <i>Cylindroiulus caerulecinctus</i> (Julida)	Firmicutes y bacteroidetes	Microscopia (MEB y de luz)		(Nardi et al., 2016) en EUA
<i>Anadenobolus monilicornis</i> (Spirobolida) 2 especímenes	Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes	Shotgun Nanopore		(Geli-Cruz, 2019) en Puerto Rico
<i>Telodeinopus aoutii</i> (Spirostreptida) 4 especímenes	Proteobacteria (Gammaproteobacteria) <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Kosakonia</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> . Actinobacteria, Streptomycetes. Firmicutes (<i>Bacillus thuringensis</i>)	Secuenciación del ARNr 16S a partir de cepas	Aislar potenciales bacterias celulolíticas	(Koubová et al., 2023) en República Checa

2.4. Microbiota del suelo: Un ecosistema de alta diversidad

El suelo es un ambiente complejo donde se puede encontrar una gran diversidad de organismos eucariotas y procariotas, así como también virus (Uroz et al., 2013). Por tener una vasta diversidad microbiana se ha ganado la reputación de ser uno de los ambientes más diversos del planeta. Se estima que en tan solo un gramo de suelo se pueden encontrar entre 2,000 y 18,000 genomas microbianos diferentes (Xu et al., 2014).

El análisis de las poblaciones microbianas presentes en el suelo ha sido fundamental para comprender la funcionalidad de los ecosistemas naturales (van Elsas y Boersma, 2011). Este enfoque ha permitido explorar las complejas interacciones entre estos microorganismos y la diversidad funcional que caracteriza a los diferentes tipos de suelos (Xu et al., 2014). Se ha establecido que tienen un importante papel en la degradación de materia orgánica y ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno, proveyendo así de nutrientes a las plantas; tanto estas funciones, como la amplia biodiversidad de bacterias, se ven influenciadas fuertemente por factores ambientales relacionados con las características edáficas (disponibilidad de nutrientes, pH), climáticas e interacciones bióticas, siendo posible conocer cómo este ecosistema funciona mediante la diversidad microbiana encontrada, siendo el horizonte de materia orgánica donde las comunidades microbianas presentan mayor actividad metabólica (Uroz et al., 2013).

A pesar de la importancia de estos estudios, muchos de ellos se han basado en técnicas de cultivo tradicionales, lo que ha llevado a una representación limitada de la diversidad microbiana, estimándose que solo el 1% de esta diversidad ha sido abordada en dichos estudios, y muy poco es conocido acerca de la diversidad, funcionalidad y las interacciones de estos microorganismos. A pesar de esta limitación, se han identificado nuevos genes que codifican enzimas con

propiedades antimicrobianas que podrían tener aplicaciones prácticas (van Elsas y Boersma, 2011; Xu et al., 2014).

Para abordar esta limitación, los métodos moleculares han surgido como una alternativa altamente sensible para la identificación de la microbiota del suelo (van Elsas y Boersma, 2011). Más recientemente, las técnicas metagenómicas se han aplicado en el estudio de las comunidades bacterianas del suelo, centrándose en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S. A pesar de estos avances, aún se carece de datos sobre el perfil funcional de estas comunidades, especialmente en suelos altamente diversos (Xu et al., 2014).

En este contexto, investigaciones como la de Xu et al. (2014), que analizan cinco tipos de suelos (pastizales, bosques, desierto, suelo ártico y manglar) con un enfoque funcional, son cruciales para el avance del campo (Figura 4). Los resultados revelan que el filo Proteobacteria es el más abundante (>70%) en todas las muestras, excepto en el desierto. Además, se observa que la familia más común en bosques y pastizales es Methylocystaceae, mientras que Ectothiorhodospiraceae y Desulfobulbaceae son predominantes en los suelos de manglar (Xu et al., 2014).

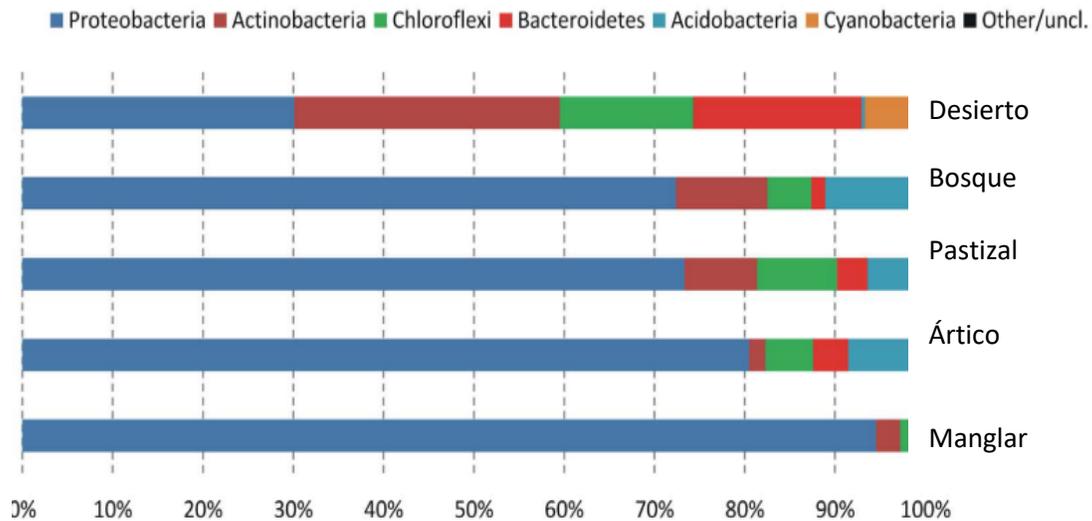


Figura 4. Análisis de las bacterias que se encuentran en diferentes tipos de suelo (Xu et al., 2014).

En ecosistemas áridos, como los desiertos, la tasa de descomposición está restringida por la disponibilidad limitada de agua, nitrógeno y carbono. Por lo tanto, los microorganismos del suelo, incluyendo hongos y bacterias capaces de degradar celulosas, desempeñan un papel fundamental en estos procesos. Algunos de estos microorganismos se originan en el tracto gastrointestinal de invertebrados, lo que destaca la importancia de los organismos del suelo en la descomposición de materia orgánica en estos ambientes áridos (Taylor, 1982).

La microbiota del suelo es un campo en constante evolución que sigue siendo de gran relevancia en la comprensión de los ecosistemas terrestres y su funcionalidad. Su estudio continuo y enriquecedor arrojará luz sobre la diversidad y la función de los microorganismos en el suelo, con posibles implicaciones en campos que van desde la ecología hasta la biotecnología.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de su importancia en los ecosistemas debido a su papel crucial en la descomposición de la materia orgánica del suelo, los milpiés han sido objeto de una atención limitada en la investigación científica. Actualmente, se cuenta con un conocimiento limitado sobre la interacción de estos organismos con su comunidad microbiana intestinal, así como el papel que estos microorganismos desempeñan en la degradación de los alimentos consumidos por los diplópodos.

Es importante destacar que, aunque se menciona como un factor relevante en estudios previos, la mayoría de las investigaciones han dejado de lado el análisis del microbioma del suelo en el que se colectan los especímenes. Además, la mayoría de estos estudios anteriores se basan en técnicas tradicionales de secuenciación, sin aprovechar la potencialidad de la secuenciación paired-end mediante la plataforma de Illumina, lo que limita la comprensión integral de estas interacciones.

Cabe señalar que en México no existen trabajos previos que aborden la microbiota intestinal de los miriápodos, lo que representa una brecha significativa en el entendimiento de la ecología de estos organismos.

Por tanto, este estudio tiene como objetivo fundamental comprender la interacción entre los microorganismos intestinales y los milpiés, así como la relación que ambos mantienen con su microambiente circundante, empleando tecnología de secuenciación de siguiente generación.

En este contexto, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son las bacterias presentes en el intestino de los milpiés de Sinaloa, México, y cómo se relaciona la microbiota intestinal de los milpiés con la microbiota del suelo circundante?

IV. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de investigaciones en México sobre la microbiota intestinal de los milpiés representa una laguna significativa en la comprensión de la ecología de estos organismos en el país. Este estudio tiene el mérito de ser el primero en abordar esta temática en México, lo que constituye un importante aporte al conocimiento científico local. Además, será pionero en la combinación de análisis de la microbiota intestinal de los milpiés y la del suelo que habitan, lo que permitirá una visión holística de las interacciones microbianas en estos ecosistemas terrestres.

Uno de los aspectos fundamentales de este trabajo es su potencial para arrojar luz sobre la diversidad y funcionalidad de los microorganismos presentes tanto en el suelo como en los milpiés. Comprender estas relaciones esenciales en los ecosistemas puede abrir la puerta a investigaciones posteriores con aplicaciones significativas en los campos de la ecología y la evolución.

Este estudio proporcionará conocimientos valiosos sobre las complejas interacciones entre microorganismos y sus huéspedes, lo que podría tener implicaciones importantes en la conservación y gestión de los ecosistemas terrestres. Además, la identificación de bacterias intestinales que secretan metabolitos con propiedades antimicrobianas podría tener un potencial impacto en el desarrollo de terapias antibióticas, como ha sido propuesto en investigaciones previas (Glukhova et al., 2018).

Este estudio no solo contribuirá al entendimiento de la ecología de los milpiés y su microbiota, sino que también sentará las bases para investigaciones futuras con aplicaciones ecológicas y médicas.

V. HIPÓTESIS

La microbiota bacteriana en el tracto gastrointestinal de *Orthoporus ornatus* presenta diferencias significativas en su diversidad y refleja interacciones específicas en comparación con la microbiota bacteriana presente en el suelo circundante en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal de *Orthoporus ornatus* y su respectivo suelo colectados en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa.

6.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar metagenómicamente las bacterias del tracto gastrointestinal de *Orthoporus ornatus*.
2. Caracterizar metagenómicamente las bacterias del suelo donde se colectaron los milpiés.
3. Evaluar la diversidad de la microbiota bacteriana encontrada entre milpiés y su hábitat.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo se encuentra dividido en tres fases principales: La toma de las muestras, el procesamiento molecular y los análisis bioinformáticos (Figura 5).

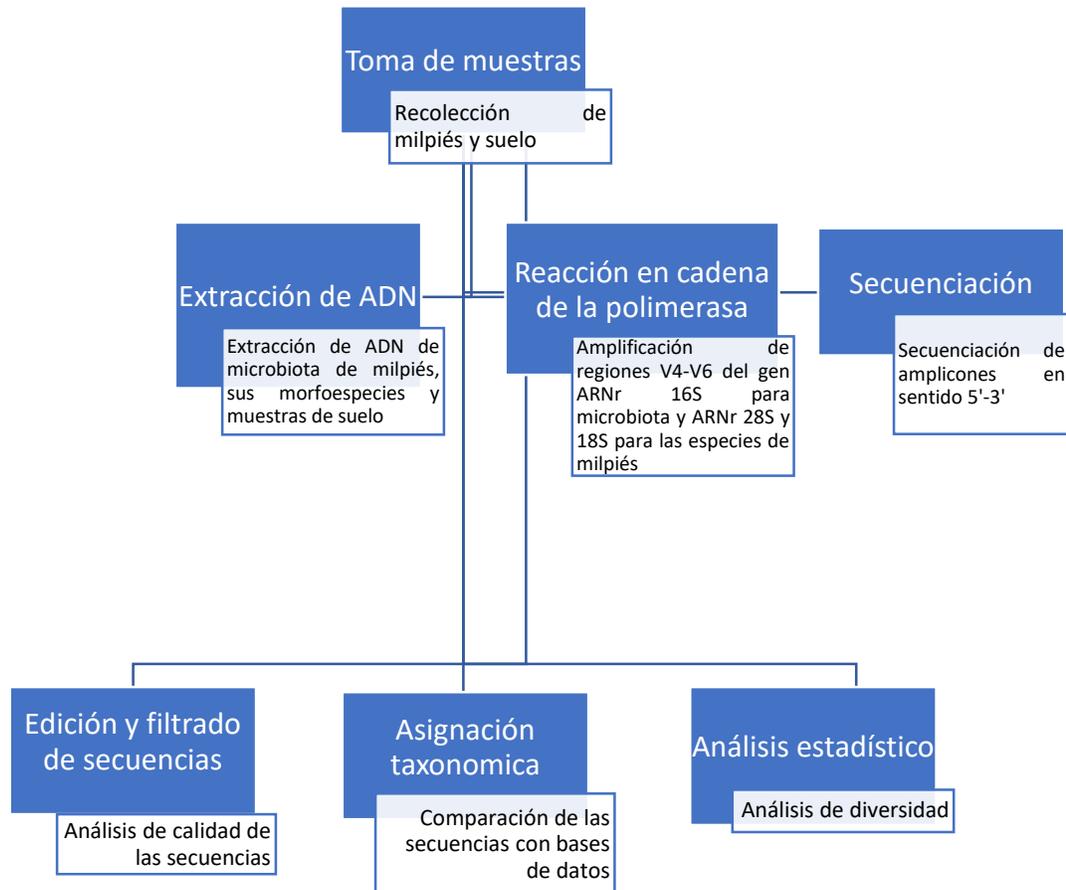


Figura 5. Diagrama experimental.

7.1. Lugar de recolección de los datos

Las muestras se recolectaron en El Carmen, ubicado en el municipio de San Ignacio, en el estado de Sinaloa, México (23.859, -106.504).

De acuerdo con el Atlas de riesgos de SEDATU (2014), el municipio de San Ignacio está localizado al sur de Sinaloa (Figura 6), cubriendo una superficie de 5,068.54 km², con una altitud que oscila entre los 100 y los 2,800 msnm. Las provincias biogeográficas de la Sierra Madre Occidental y la Llanura Costera del Pacífico se encuentran pasando sobre el municipio. En cuanto a su geomorfología, el municipio cuenta con planicies, piedemonte y lomeríos, estos últimos encontrados en el lugar de muestreo. Los lomeríos son eminencias de terreno, conocido también como loma o collado; se presentan lomeríos bajos, alcanzando altitudes entre 250 y 500 msnm, y lomeríos altos, cuya altitud va de 500 a los 1,500 msnm.

Sobre los periodos geológicos por los que ha pasado el municipio se encuentra el Cenozoico con un 73.67% de la superficie, Mesozoico con 0.31%, el Precámbrico con 0.15% y el Paleozoico con 0.031%. Y sobre los tipos de suelo que se pueden encontrar está el feozem, fluvisol, regosol y litosol; este último es el que se encuentra en mayor porcentaje, cubriendo el 61.85% de la superficie de San Ignacio.

Este municipio cuenta con el registro de 408 localidades. Específicamente, la localidad de El Carmen se encuentra a una altitud de aproximadamente 170 msnm, en la zona neotropical. El clima predominante es cálido y húmedo/semihúmedo y la vegetación característica en esta región corresponde al bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 2006).



Figura 6. Ubicación del lugar de muestreo en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa, México (Imagen tomada de Wikipedia.org).

7.2. Tipo de estudio

Este estudio se enmarca con un enfoque exploratorio, descriptivo y transversal.

7.3. Muestra

7.3.1. Tamaño de la muestra

En el municipio de San Ignacio, se recolectaron un total de 13 especímenes de *Orthoporus* sp. y 13 muestras de suelo. Sin embargo, después de realizar las extracciones solo se obtuvieron 14 por complicaciones de extracción debido a la naturaleza de las muestras de suelo. Las extracciones correspondieron a seis muestras de suelo y ocho muestras del contenido intestinal de los milpiés. Las etiquetas correspondientes se presentan en el Cuadro 2 y el significado de las abreviaturas se explica en el capítulo 7.4.2.

Cuadro 2. Muestras de milpiés y su correspondiente muestra de suelo a los que se les extrajo ADN.

Muestra de milpiés	Muestra de suelo
L1M2D1	L1M2S1
L1M2D3	L1M2S4
L1M2D4	L1M2S5
L1M2D5	M7S1
L1M2D9	M9S1
M7D1	M12S1
M9D1	
M12D1	

7.3.2. Tipo de muestreo

La colecta de los milpiés se realizó de manera manual, siguiendo senderos identificados en el sitio de recolección, siguiendo las metodologías descritas por Luna (2005) y Guerrero-Vázquez (2004). Se dio especial atención a las áreas cercanas a fuentes de agua, y se enfocó particularmente en la búsqueda debajo de troncos en estado de descomposición y rocas.

Las muestras de suelo fueron tomadas una vez localizados los milpiés; retirando la materia orgánica superficial con una pala de jardinería y tomando 5 g de suelo con una cuchara desechable limpia.

7.3.3. Criterios de inclusión

Se consideraron en la muestra únicamente especímenes adultos de milpiés.

7.3.4. Criterios de exclusión

Se excluyeron del análisis aquellos individuos juveniles de milpiés que eventualmente fueron encontrados.

7.3.5. Criterios de eliminación

Se descartaron del estudio las muestras que presentaban algún tipo de daño durante el proceso de transporte hacia el laboratorio.

7.4. Metodología

Con las muestras obtenidas en el presente trabajo, se realizó un análisis de la diversidad bacteriana en el que se utilizaron análisis metagenómicos. Este análisis permitió describir a los diferentes grupos bacterianos presentes tanto en el intestino de milpiés como en el suelo que estos habitan.

7.4.1. Recolección de las muestras

Cada muestra recolectada se registró con información de geolocalización precisa, así como la hora y fecha de obtención. Para el manejo de las muestras, se utilizó una bolsa de polietileno de la marca Ziploc® para contener la muestra del espécimen de milpiés.

La recolección de muestras de suelo se llevó a cabo utilizando cucharas de plástico nuevas y limpias en los sitios donde se capturaron los milpiés. Cada muestra de suelo se colocó en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas con información que incluía el nombre del lugar, fecha, hora y su correspondencia con la muestra de milpiés.

Además, se obtuvo una muestra adicional de suelo a una profundidad de 30 cm con el propósito de formar una muestra representativa de las características fisicoquímicas del suelo en cada lugar de muestreo. Estas muestras de suelo se recolectaron en bolsas de plástico de color negro.

Se recolectaron 2 kg de muestras de suelo en cada sitio de muestreo, tomando muestras de las áreas donde se localizaron los milpiés. Estas muestras se homogeneizaron tamizándolas a través de una malla de 1 mm. Posteriormente, se almacenaron en costales y se transportaron al Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología, donde se conservaron a una temperatura de 4 °C hasta su análisis.

El procedimiento de recolección de las muestras de suelo se llevó a cabo siguiendo la Guía Técnica para el Muestreo de Suelos (Mendoza y Espinoza, 2017).

7.4.2. Etiquetado de las muestras

Cada muestra fue debidamente etiquetada para su identificación y posterior análisis. Las etiquetas se conformaron siguiendo un formato específico, donde "L" hacía referencia al lugar de recolección (por ejemplo, "L1" para San Ignacio), "M" se asociaba con el número de secuencia de muestreo realizado, "S" indicaba que se trataba de una muestra de suelo y "D" señalaba que correspondía a una muestra del diplópodo. De esta manera, cada muestra quedó identificada de manera única, por ejemplo: "L1M1S1" y "L1M1D1" (Cuadro 2).

7.4.3. Procesamiento de las muestras

Los milpiés recolectados fueron inmediatamente colocados en bolsas de polietileno junto con sustrato del lugar de muestreo. Estas muestras fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa en una hielera estéril para prevenir la contaminación.

Una vez en el laboratorio, se procedió a desinfectar la superficie exterior de los milpiés antes de realizar cortes para aislar el tracto gastrointestinal. Para sacrificar a los milpiés, se utilizaron condiciones de congelación a -20 °C durante 15 min. Durante todo el proceso, se mantuvo la esterilidad de las superficies de trabajo, el exterior del cuerpo de los milpiés y las herramientas de disección mediante el uso de etanol al 70%.

Posteriormente, se procedió a cortar las patas de los milpiés y a realizar un corte longitudinal para eliminar los bordes del exoesqueleto, dejando al descubierto los órganos internos. Con la ayuda de herramientas de disección, se aisló el tubo digestivo y se separó del resto de los tejidos, siguiendo la técnica de Ortega-Ávila (2014). El intestino se colocó en una caja de Petri estéril y se colectó el contenido en un tubo Eppendorf. A partir de esta muestra, se obtuvo una submuestra que se conservó en solución de preservación utilizando el kit Swab Collection & Total RNA Preservation System (Norgen Biotek Corp.). De donde posteriormente se hizo la extracción de ADN para la secuenciación. El resto de la muestra se sumergió en agua peptonada amortiguada para llevar a cabo diluciones seriadas para su cultivo microbiológico posterior.

Una vez extraído el intestino de cada espécimen de milpiés, se conservaron aquellas estructuras morfológicas empleadas en la identificación taxonómica: cabeza, telson, algunos diplosegmentos y gonópodos en el caso de los machos. Los procedimientos de clasificación morfológica se llevaron a cabo utilizando guías taxonómicas (Bueno-Villegas et al., 2004; Golovatch et al., 1995).

Para las muestras de suelo, se tomaron 0.4 g de cada muestra para ser conservados en la misma solución de preservación hasta la posterior extracción de material genético. Además, para la caracterización fisicoquímica del suelo se siguió el protocolo establecido en la Norma Oficial

Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de Riego y Drenaje de la Comisión Nacional del Agua.

7.4.4. Extracción de ADN y amplificación

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit PowerSoil DNA Isolation Kit (PowerLyzer, MO BIO) siguiendo el protocolo del fabricante. Para la reacción de PCR, se preparó una mezcla que contenía agua libre de nucleasas, buffer 10X, dNTPs (10 mM), polimerasa y ADN de las muestras. Además, se emplearon primers específicos 518F-800R, previamente reportados por Lu et al. (2000), diseñados para amplificar las regiones V3 y V4 del ARNr 16S. La calidad de la extracción de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Quantus de Promega.

Para este proceso se colocó 1 μ L de muestra en el espectrofotómetro para medir su absorbancia en relación 260/280 nm. Un valor óptimo cercano a 1.8 indicó pureza y la absorbancia a 260 nm reflejó la concentración.

Las condiciones de amplificación se ajustaron siguiendo un nuevo protocolo descrito en el Cuadro 3 y se realizaron en un termociclador T100 Thermal Cycler de BioRad. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 1 μ L de GelRed 1X de Biotium Inc., EE. UU. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 50 min y las bandas de ADN se visualizaron utilizando un fotodocumentador Digi Doc-It, UVP, USA. Las muestras se enviaron al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) unidad Mazatlán para su secuenciación.

Cuadro 3. Condiciones de PCR que se utilizaron para extracción de ARNr 16S (Lu et al., 2000).

Primers	Secuencia (5' - 3')	Condiciones de PCR
518F	CCAGCAGCCGCGGTAATACG	(94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min) X 35
800R	TACCAGGGTATCTAATCC	

7.4.5. Secuenciación

La secuenciación de las muestras se realizó mediante la ligación de adaptadores con el kit TrueSeq DNA HT para la plataforma Illumina. El proceso de secuenciación se efectuó en un secuenciador MiSeq utilizando el protocolo paired-end, siguiendo las recomendaciones de Rogers y Backus (2014). Se emplearon los oligos para V3 16S-V3_338f y 16S-V3_533r para secuencias pareadas, con una longitud de 125 nucleótidos: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' y 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 min, 30x (95 °C 30s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C durante 5 min. Se realizó una segunda PCR con el objetivo de generar librerías finales de secuenciación.

7.4.6. Análisis bioinformático y estadístico

El procesamiento de los archivos FASTQ se llevó a cabo utilizando Trimmomatic (Trim Galore versión 0.6.7.) dentro del sistema operativo de Linux. Se generaron OTUs con un control de calidad que incluyó valores Phred >25, y se realizó el filtrado y la eliminación de quimeras para su posterior procesamiento. Para evaluar la calidad de las lecturas obtenidas, se realizaron análisis exhaustivos utilizando 48 archivos FASTQ provenientes de la secuenciación, incluyendo dos archivos por cada muestra (Read1 y Read2). Después de concatenar las muestras

resecuenciadas, se procedió a trabajar con un total de 28 archivos FASTQ. Posteriormente, las secuencias filtradas fueron cargadas a la base de datos de EZBioCloud (Yoon et al., 2017) para su alineación y comparación con secuencias de referencia previamente reportadas, lo que permitió realizar asignaciones taxonómicas utilizando BLAST (Altschul et al., 1990). Las lecturas de muestras de intestino de milpiés y suelo se normalizaron a 12,000 y 8,000 respectivamente.

Para la composición y abundancia de cada taxón, se visualizó en imágenes generadas por Krona v.2.2 en EZBioCloud (Yoon et al., 2017). Se realizaron análisis de diversidad alfa utilizando el índice de Simpson y Shannon para cada muestra y análisis de diversidad beta mediante el índice de Bray-Curtid para comparar las muestras de acuerdo con su procedencia. Se realizó un mapa de calor de los filos bacterianos de cada muestra en R versión 4.3.1 (R Core Team, 2020) utilizando la paquetería pheatmap (Kolde, 2015). Además, se generaron curvas de rarefacción para comparar la riqueza entre los OTUs de diferentes muestras y se crearon gráficos de PCoA (Análisis de Componentes Principales) y árboles UPGMA utilizando matrices de distancia UniFrac en EZBiocloud. Finalmente, dentro de la misma base de datos se utilizaron pruebas estadísticas de análisis de varianza múltiple por permutaciones (PERMANOVA), comparando las muestras de suelo con las muestras procedentes del intestino de los milpiés para ver si existían diferencias estadísticas entre estos dos grupos.

La diversidad alfa para secuencias de milpiés y suelo se evaluó utilizando el archivo de taxonomía `Otus_table_taxanomy_L6`, calculando el número de especies efectivas según Hill (1973) y Hsieh et al. (2016). La diversidad de orden cero ($q=0$, Riqueza de especies) se define como la riqueza de especies, mientras que la diversidad de orden 1 ($q=1$, Índice de Shannon) pondera todas las especies en función de su abundancia en la comunidad. Por otro lado, la

diversidad de orden 2 ($q=2$, Índice de Simpson) otorga más peso a las especies dominantes. El análisis se llevó a cabo utilizando el paquete "iNEXT" 2.0.5 (Hsieh et al., 2016) y "vegan" v.2.3.-2 (Oksanen et al., 2015) en el entorno de R versión 3.0.3 (R Core Team, 2014), con intervalos de confianza del 95%. Se empleó una prueba de Kruskal-Wallis (K-W) implementada en la función `hilldiv::div_test` (Alberdi y Gilbert, 2019) en R para determinar las diferencias en los valores promedio de diversidad entre los sitios analizados.

7.4.7. Diversidad en México

Para evaluar el esfuerzo de muestreo de milpiés en México, se recopilaron datos de dos fuentes principales: la base de datos GBIF y la Actualización del Catálogo de Autoridades Taxonómicas de Myriapoda en México (Bueno-Villegas y Cupul-Magaña, 2020). Se asignaron valores numéricos para indicar la presencia o ausencia de cada especie en los diferentes estados. Posteriormente, se generó un mapa de diversidad nacional y se estimó la diversidad de Diplopoda a nivel nacional con iNEXT (ver descripción arriba). El análisis se realizó con 200 réplicas bootstrap y se estableció un intervalo de confianza del 95% para los resultados.

7.5. Lugar de realización

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

7.6. Financiamiento.

El proyecto fue financiado por los integrantes del Cuerpo Académico Ecología Molecular y Biotecnología (UAS-CA-298): Dra. Luz Isela Peinado Guevara y el Dr. Samuel Campista León. La alumna recibió beca CONAHCYT con número de apoyo 798662.

VIII. RESULTADOS

8.1. Muestreo

Se realizaron 26 colectas distribuidas equitativamente entre 13 muestras de milpiés y 13 de suelo. De los milpiés recolectados, se identificaron tres machos y diez hembras, variando en tamaño de 5.8 a 10 cm, con un promedio de 7.9 cm (± 1.13 cm) (Cuadro4).

Cuadro 4. Datos de colecta de los especímenes.

Etiqueta	Fecha	Hora	Altitud msnm	Sexo	Tamaño (cm)	colector	Suelo
M7D1	13/08/2022	08:41		hembra	8.5	Angel GG	M7S1
M9D1	13/08/2022	09:07		macho	8.4	Angel GG	M9S21
M12D1	13/08/2022	09:29		macho	6.9	Patricia AG	M12S1
L1M2D1	02/10/2022	08:45	334	hembra	9.5	Carlos	L1M2S1
L1M2D2	02/10/2022	09:28	336	hembra	7.5	Carlos	L1M2S2
L1M2D3	02/10/2022	09:31	336	hembra	8.4	Carlos	L1M2S3
L1M2D4	02/10/2022	09:40	337	hembra	8	Carlos	L1M2S4
L1M2D5	02/10/2022	09:51	341	hembra	5.8	Yamel	L1M2S5
L1M2D6	02/10/2022	10:05	341	hembra	8	Carlos	L1M2S6
L1M2D7	02/10/2022	10:05	341	macho	10	Carlos	L1M2S7
L1M2D8	02/10/2022	10:15	340	hembra	7.5	Aly	L1M2S8
L1M2D9	02/10/2022	11:32	357	hembra	7	Carlos	L1M2S9
L1M2D1	02/10/2022	11:47	362	hembra	7	Patricia AG	L1M2S1

8.2. Análisis de suelo

El suelo, clasificado como Areno Francoso (Ac), presentó un pH de 8.1, catalogándolo como medianamente alcalino. La conductividad eléctrica fue de 3.30 mmhos/cm, indicando una moderada presencia de sales solubles. Se observó un bajo contenido de materia orgánica del 0.3%. En términos de nutrientes, el Calcio se encontró en concentraciones medias y el Magnesio en concentraciones bajas. La correlación entre cationes y aniones fue evidente, destacando la presencia de carbonatos, bicarbonatos y sulfatos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cationes y aniones solubles en suelo.

P.S.I.	R.A.S.	CATIONES SOLUBLES (Meq/L)			Suma total
		Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺¹	
11.17	11.7	6.5	4.5	22	33

ANIONES SOLUBLES (Meq/L)				Suma total	Clasificación
CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻¹	Cl ⁻¹	SO ₄ ⁻²		
0	5	16	12	33	N

P.S.I.=Porcentaje de intercambio de sodio, R.A.S.= Relación de adsorción de sodio, Meq/L= miliequivalentes por litro.

8.3. Identificación de milpiés

De los 13 milpiés recolectados, tres fueron identificados como machos. El análisis morfológico detallado reveló que las características coincidían con las descritas por Loomis (1996) para *Orthoporus texicolens*, conocida también como sinónimo de *O. ornatus*. Aspectos distintivos incluyeron la terminación de la línea media frontal antes del labrum y la separación de las estructuras laterales del gnathochilarium por el mentón, así como la conformación de los

gonópodos (Figura 7). Esto confirmó la identificación precisa de los especímenes como *Orthoporus texicolens*, ampliando el conocimiento sobre su diversidad en la región estudiada.

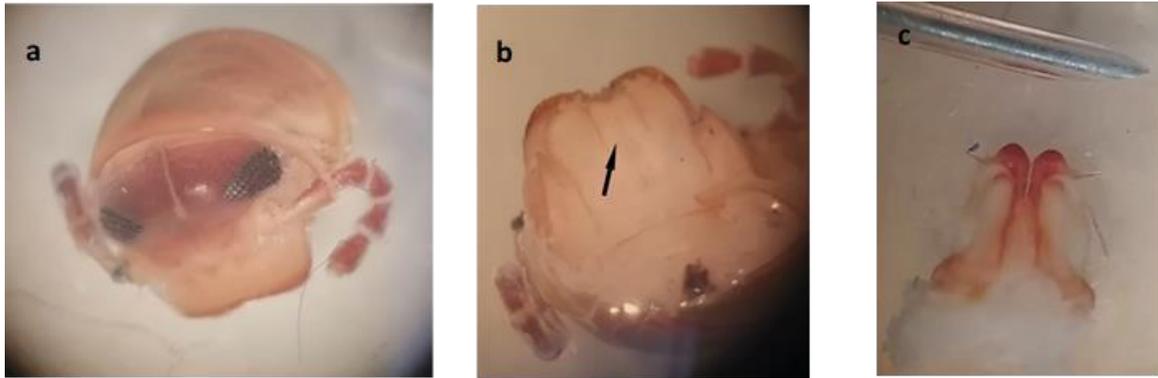


Figura 7. Estructuras anatómicas claves para la identificación de los milpiés, vista en microscopio estereoscópico de un *O. ornatus* adulto macho. a) cabeza de un milpiés macho; b) Gnathochilarium del mismo individuo y c) Gonópodos

8.4. Cuantificación del ADN extraído

Para evaluar la cantidad de ADN genómico obtenida en las extracciones, se llevaron a cabo mediciones de concentración en cada muestra. Destacan las concentraciones más altas registradas en las muestras M7D1 y M9D1, con valores de 202.75 ng/ μ L y 92.5 ng/ μ L, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones más bajas se observaron en las muestras L1M2S5 y L1M2D3, que presentaron valores de 5.025 ng/ μ L y 5.2 ng/ μ L, respectivamente (Cuadro 6). La concentración promedio fue de 35.206 ng/ μ L.

Cuadro 6. Resultados de cuantificación de cada muestra.

Muestra	Volumen de lectura (μL)	Lecturas de concentración (ng/ μL)				Concentración (ng/ μL)
		1	2	3	4	
L1M2D1	1	6.3	6.5	6	6	6.2
L1M2D3	1	5.3	5.2	5.2	5.1	5.2
L1M2D4	1	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
L1M2D5	1	7	6.6	6.8	6.7	6.775
L1M2D9	1	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3
L1M2S1	1	10	10	9.7	9.5	9.8
L1M2S4	1	12	12	12	12	12
L1M2S5	1	5.1	5	5	5	5.025
M9D1	1	95	91	91	93	92.5
M9S1	1	23	22	22	22	22.25
M12D1	1	72	68	73	70	70.75
M12S1	1	24	26	25	25	25
M7S1	1	23	24	24	24	23.75
M7D1	1	188	192	214	217	202.75

8.5. Secuenciación

El proceso de secuenciación generó un conjunto total de 651,464 secuencias, de las cuales 448,920 lograron cumplir con los criterios de calidad preestablecidos. Para evaluar la calidad de las secuencias obtenidas, se incluyen en el Cuadro 7 diversos parámetros relevantes.

Cuadro 7. Análisis de calidad de la corrida.

Muestra	Total secs.	Secs. filtro	lowQ	<148
L1M2D1	120096	96886	17102	5940
L1M2D3	64830	26212	15932	22642
L1M2D4	64036	41104	19228	3644
L1M2D5	86706	60354	11790	14462
L1M2D9	55084	30280	17066	7688
L1M2S1	33646	18890	11878	2850
L1M2S4	34378	23856	11878	2696
L1M2S5	28436	20062	6778	1566
M12D1	21282	17522	3632	94
M12S1	20702	15906	4048	730
M7D1	16962	12924	3974	36
M7S1	24614	19640	4568	374
M9D1	56778	46068	6470	4166
M9S1	23914	19216	4212	468

Total Secs = total se secuencias; Secs Filtro = secuencias pasan filtro; LowQ = secuencias menores a Q30; <148 = secuencias menores a 148 bases

Dado que algunas muestras no cumplieron con los filtros de calidad y el número de secuencias que pasaron el filtro fueron muy bajas, se optó por resecuenciarlas, lo cual se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Muestras resencuenciadas.

Muestra	Total secs	Secs filtro	lowQ	<148
L1M2D3	84750	31458	21498	31752
L1M2D9	113030	62288	34656	15956
L1M2S1	42010	22494	15470	4014
L1M2S4	65114	43868	15458	5714
L1M2S5	34408	23888	8402	2076
M12D1	42794	34978	7586	172
M12S1	30770	23344	6258	1126
M7D1	37284	28304	8840	80
M7S1	27272	21042	5698	494
M9S1	40896	32314	7642	864

Total Secs = total se secuencias; Secs Filtro = secuencias pasan filtro; LowQ = secuencias menores a Q30; <148 = secuencias menores a 148 bases

8.6. Análisis de calidad de las lecturas

La calidad de las secuencias, evaluada mediante FASTQC, reveló que 12 de las muestras presentaron una puntuación phred superior a 28, indicando una calidad satisfactoria en la mayoría de las muestras, tal como se detalla en la Figura 8.

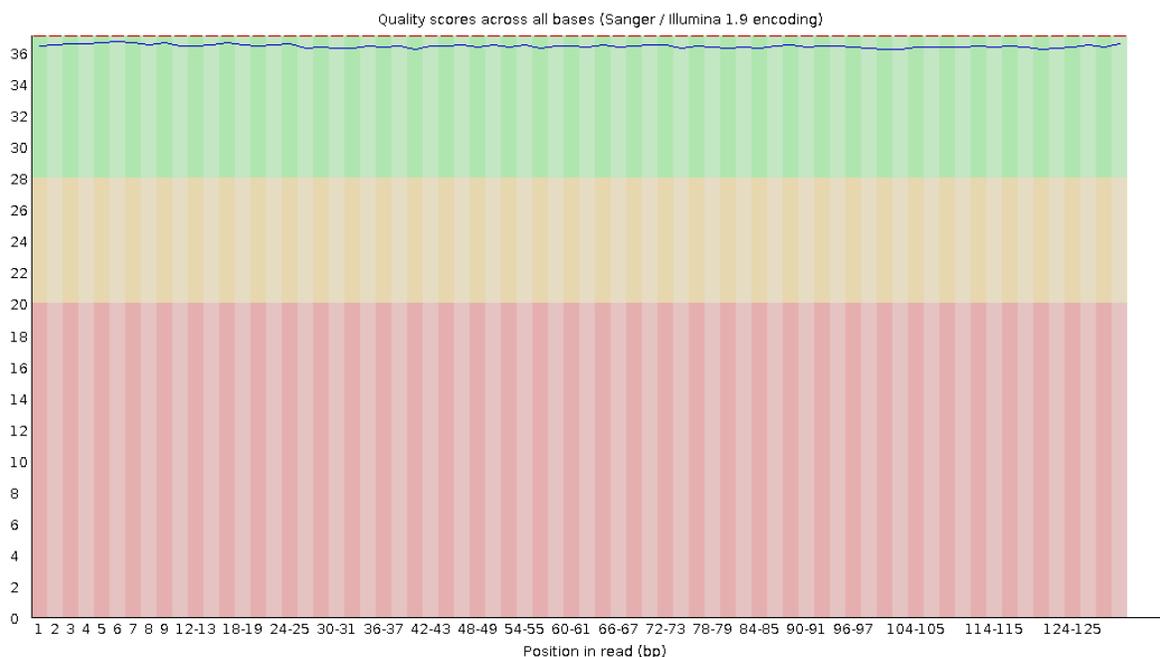


Figura 8. Resultado de la calidad de secuencia por base de la muestra L1M2D1.

8.7. Composición por muestra en intestino de milpiés

El análisis reveló una diversidad de entre 209 a 452 especies bacterianas por muestra. Los índices de Shannon variaron entre 3.109 y 5.913, reflejando una amplia diversidad bacteriana. Predominaron las Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, con familias destacadas como Rikenellaceae, Porphyromonadaceae, Bacteroidaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Christensenellaceae, Desulfovibrionaceae, Erwiniaceae, Rhodospirillaceae y Yersiniaceae. Estos resultados se visualizan en la Figura 9.

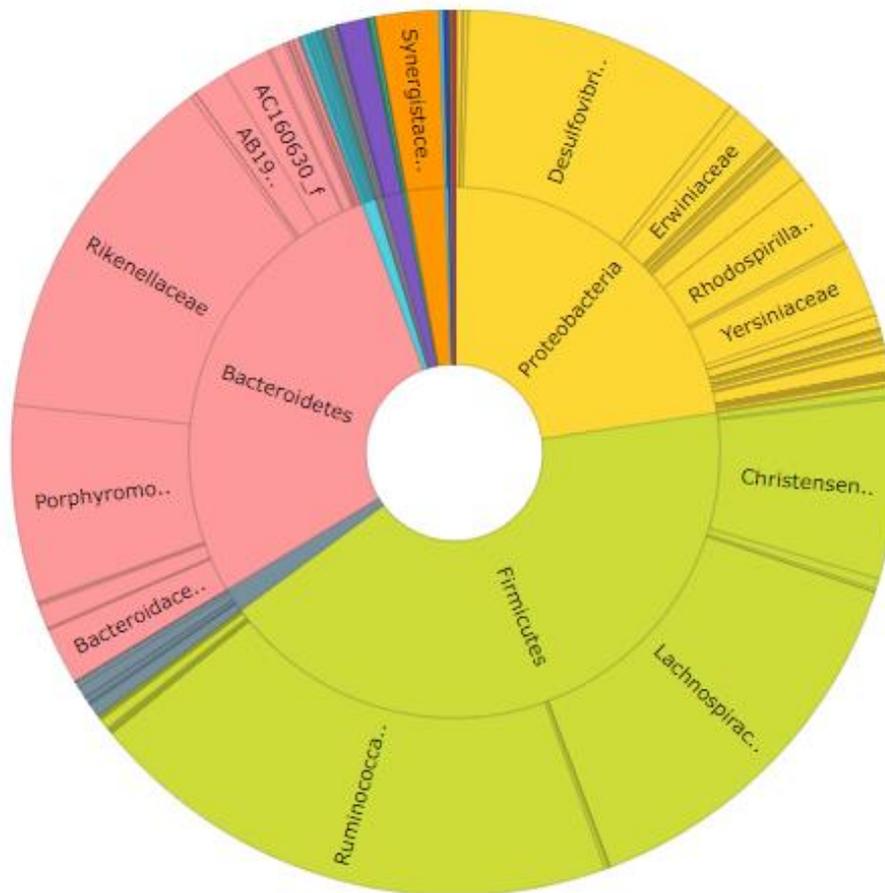


Figura 9. Grupos bacterianos más representativos en el intestino de milpiés (círculo interno Filo y círculo externo familias).

Distribución de filos bacterianos

La distribución específica de los filos bacterianos en cada muestra se muestra en la Figura 10. Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria fueron predominantes en distintas muestras. Notablemente, Bacteroidetes constituyó hasta el 57.66% en la muestra M9D1. Firmicutes fue predominante en varias muestras, alcanzando hasta el 75.76% en L1M2D5. Proteobacteria destacó particularmente en la muestra L1M2D4 con un 50.97%. Otros filos presentes en menor medida incluyeron Verrucomicrobia, Planctomycetes, Actinobacteria, Elusimicrobia y Synergistetes, con Elusimicrobia observado exclusivamente en L1M2D4.

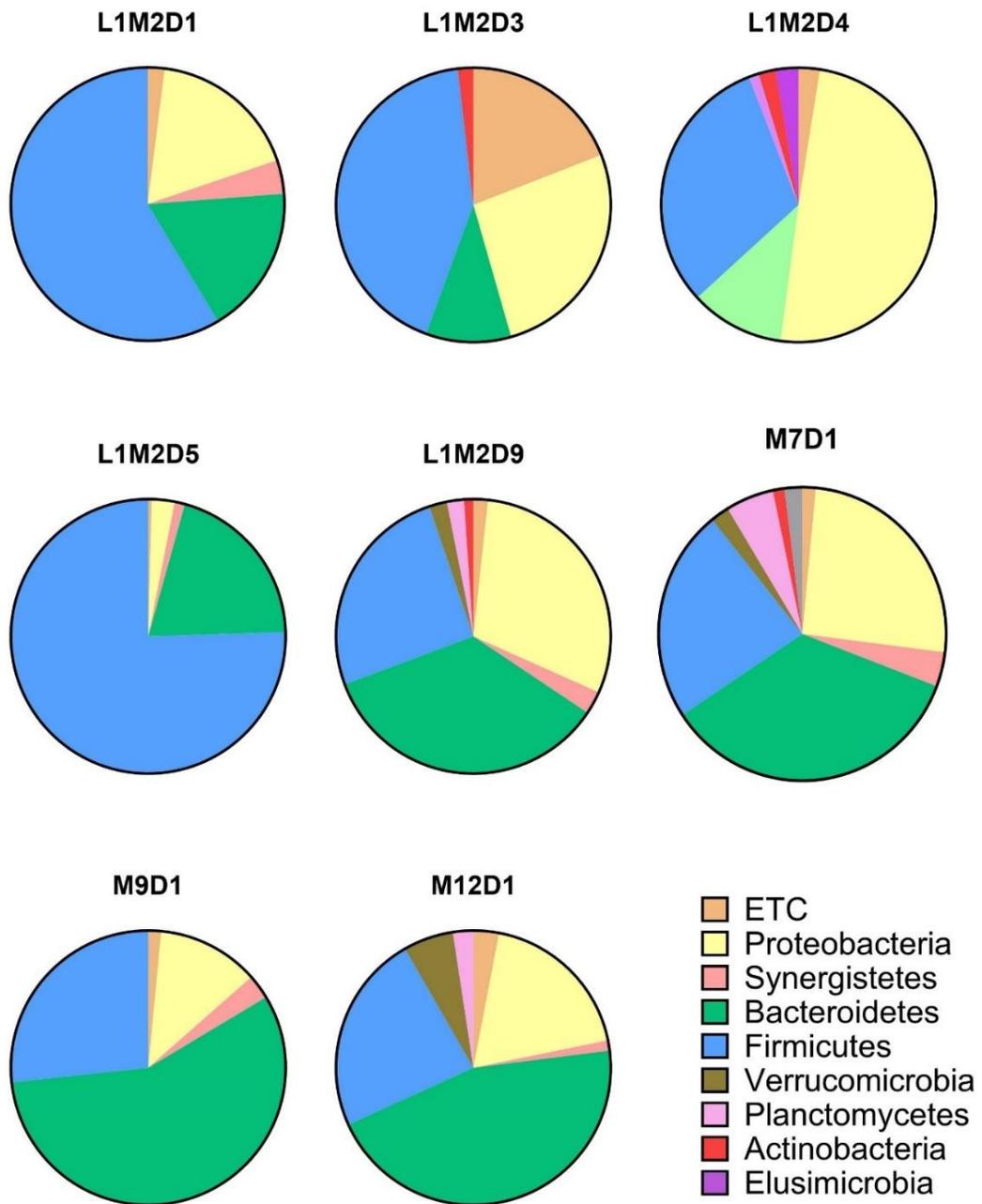


Figura 10. Grupos bacterianos (filos) encontrados en cada muestra de intestino de milpiés (ETC \leq 1%).

8.7.1. Especies bacterianas identificadas en intestino de milpiés

Del total de secuencias analizadas en los intestinos de los milpiés, 39,637 no pudieron ser identificadas a nivel de especie, y 23,618 correspondieron a especies con menos del 1% de presencia en las muestras. *Alistipes_uc* del filo Bacteroidetes fue la especie más abundante, presente en todas las muestras con un total de 6,089 OTUs. Dentro del filo Firmicutes, EF404556_g_uc y FJ904262_s también estuvieron presentes en todas las muestras, aunque en menor abundancia con 3,474 y 3,228 OTUs, respectivamente. En el filo Proteobacteria, *Desulfovibrio_g2_uc* y *Pantoea agglomerans* resaltaron con 3,323 y 1,890 OTUs respectivamente, siendo esta última específica de la muestra L1M2D4. El total de especies bacterianas identificadas se detalla en el Anexo 1.

8.8. Composición bacteriana por muestra de suelo

Para las muestras de bacterias provenientes del suelo, se obtuvieron entre 104 y 1,100 especies. En las muestras de suelo colectadas, el grupo con mayor dominancia fue Proteobacteria (Figura 11). Entre las familias que aparecen en las muestras y pertenecen a este filo se encontraron Pseudomonadaceae, Erwiniaceae, Moraxellaceae, Rhodospirillaceae, Shewanellaceae, Sphingomonadaceae, Xanthomonadaceae y Bradyrhizobiaceae.

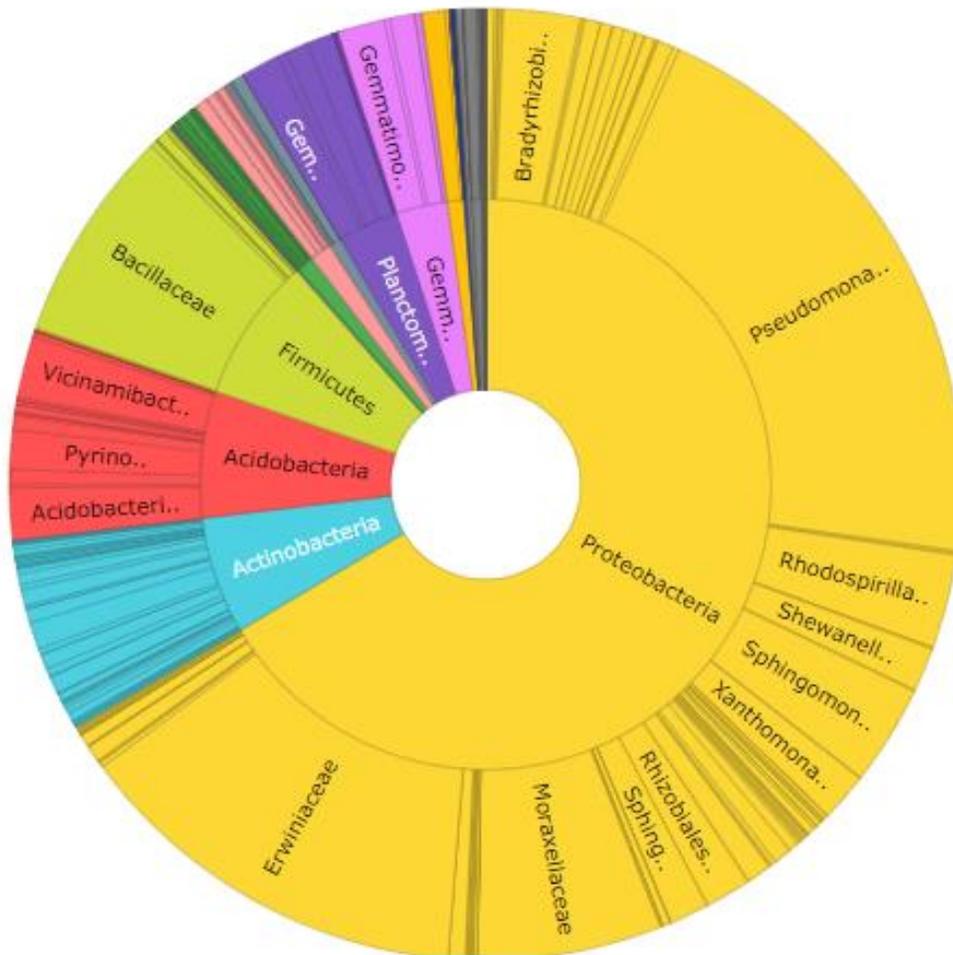


Figura 11. Filos bacterianos más representativos en las muestras de suelo (círculo interno filo y círculo externo familias).

Para cada una de las muestras de suelo, Proteobacteria representó más de la mitad de la abundancia en la mayoría de las muestras, con el 87.89% en L1M2S1, 84.20% en L1M2S4 y 64.25% en L1M2S5 (Figura 12). Los otros filos en importancia presentes predominantemente en las muestras fueron Firmicutes y Actinobacteria. El primero fue más representativo en las muestras L1M2S4 (16.3%) y L1M2S5 (7.6%), y el segundo en las muestras M7S1 (17.5%), M9S1 (24.4%) y M12S1 (11.9%). Además, se observan con mayor diversidad estas últimas 3

muestras, con Chloroflexi y Verrucomicrobia presentes solo en las muestras mencionadas. Acidobacteria se encuentra en todas las muestras de suelo, a excepción de L1M2S4, estando en un 3.1% en L1M2S1, un 1.7% en L1M2S5, 15.5% en M7S1, 11.5% en M9S1 y 17.1% en la muestra M12S1.

De manera singular, Saccharibacteria_TM7 solo se presentó en la muestra M9S1, Cyanobacteria solo se encuentra en M12S1.

La muestra que presentó menor diversidad fue L1M2S4, presentando solo los filos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

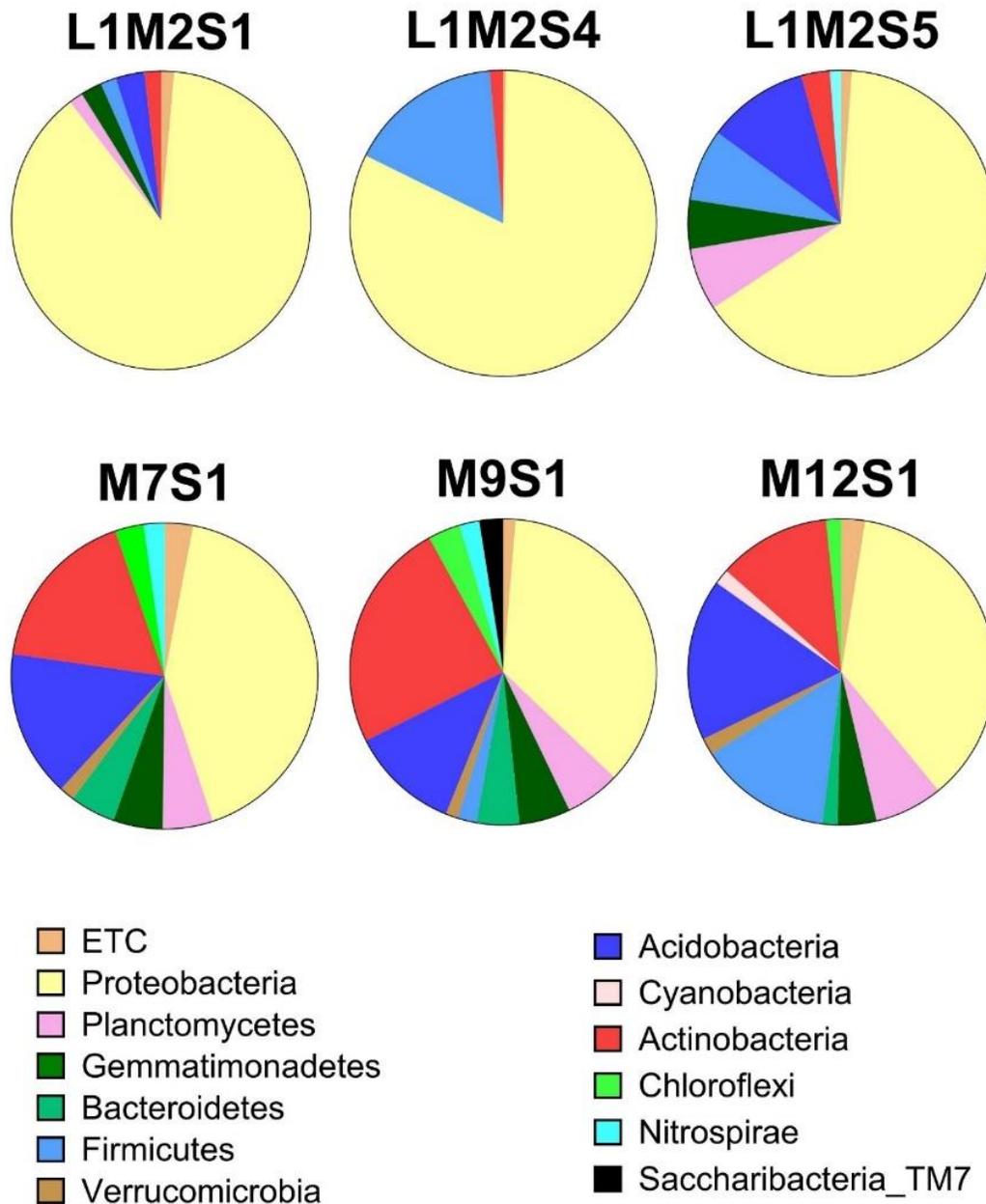


Figura 12. Filos bacterianos presentes en muestras de suelo ($ETC \leq 1\%$).

8.8.1. Especies bacterianas identificadas en suelo

De las secuencias analizadas en muestras de suelo 19,914 OTUs representaron menos del 1% del total bacteriano, y 9,300 no pudieron ser identificados a nivel de especie. Las especies más

abundantes pertenecían al filo Proteobacteria, destacando *Pseudomonas_uc* (4,155 OTUs), *Pantoea agglomerans* (4,084 OTUs), *Pseudomonas batumici* (2,311 OTUs) y *Acinetobacter_uc* (1,544 OTUs). En el filo Firmicutes, *Bacillus pumilus* sobresalió con 713 OTUs. Los detalles completos de las especies identificadas en muestras de suelo se incluyen en el Anexo 2.

8.9. Diversidad entre milpiés y suelo

Al comparar los grupos bacterianos presentes y más representativos entre las muestras de suelo y las muestras de intestino de milpiés, se puede observar que en ambos tipos de muestras predominan los filo Proteobacteria y Firmicutes, aunque el primero se encuentra en mayor abundancia en suelo y el segundo prevalece más en intestino de milpiés. Bacteroidetes se observa como abundante solo en muestras de intestino de milpiés.

En el mapa de calor (Figura 13), la contribución relativa muestra en color verde los filos poco abundantes dentro de cada muestra, mientras que los filos con mayor abundancia se muestran en color rojo. Tanto en las muestras de suelo como de intestino de milpiés, el análisis de columnas diferenció a los filos Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes con una gran contribución relativa. Además, se generó un dendrograma en filas, separando a las muestras con base en su contribución para cada grupo bacteriano dado, demostrando dos grupos bien diferenciados, por un lado, un grupo contiene todas las muestras provenientes del intestino de los milpiés, y el otro grupo se encuentran todas las muestras de suelo y la muestra LIM2D4 aparece de forma aislada dentro de este segundo grupo.

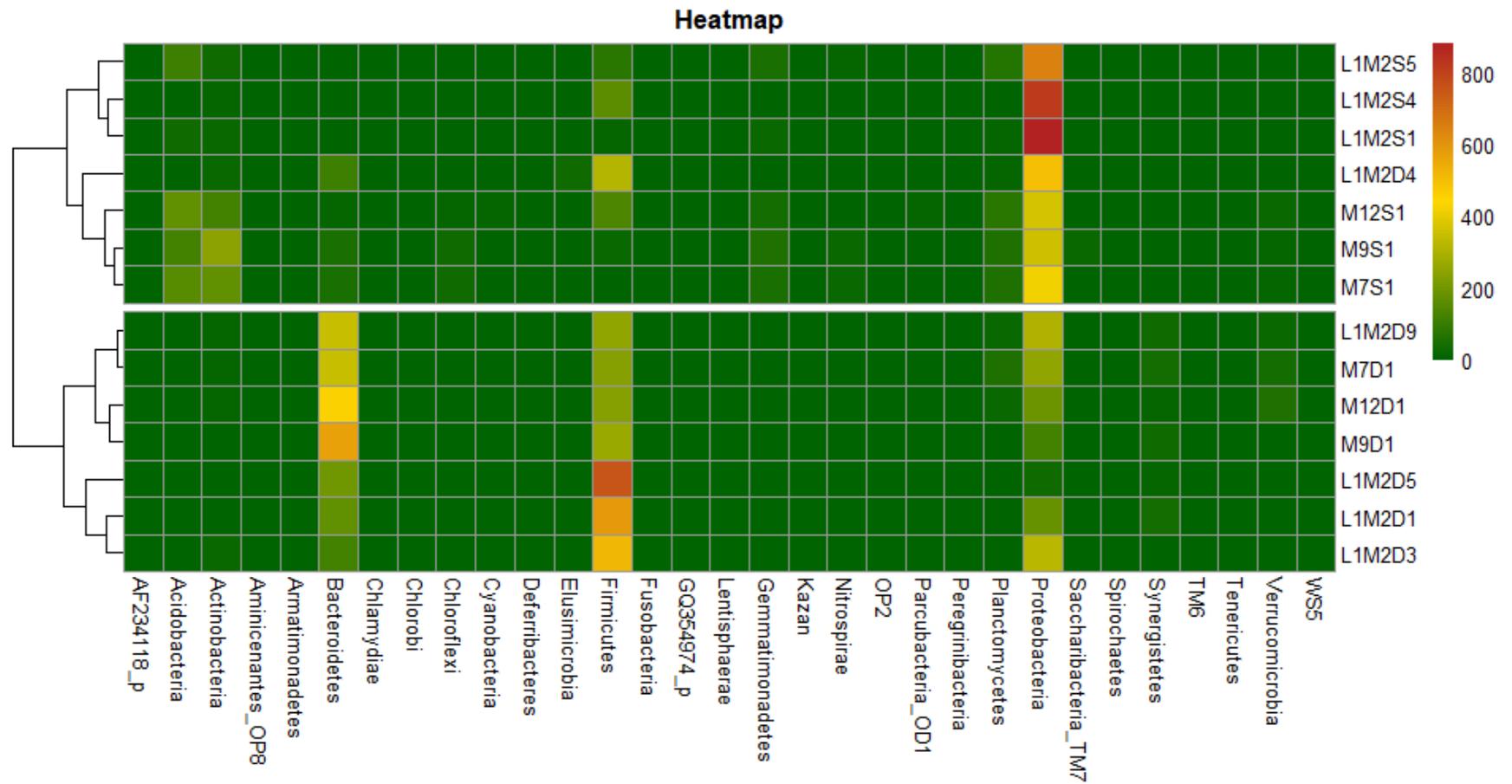


Figura 13. Mapa de calor para muestras de suelo e intestino de milpiés, agrupado jerárquicamente a nivel de filos con abundancias mayores al 1%. La escala de color superior derecha indica la abundancia relativa normalizada.

Al comparar la diversidad entre las muestras de intestino de milpiés y suelo correspondientes al mismo punto de muestreo se observa a simple vista que la predominancia de ciertos grupos bacterianos en una y otra muestra son diferentes. Para el caso de las muestras etiquetadas como M7D1 y M7S1 (Figura 14), algunos filos se encuentran presentes en el suelo y ausentes en el intestino de milpiés, tales como Acidobacterias, Chloroflexi, Actinobacterias y Gemmatimonadetes. Y los grupos Firmicutes y Nitrospirae se observan solamente en el intestino de milpiés. Los grupos bacterianos que fueron compartidos por ambos son Proteobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes y Bacteroidetes, sin embargo, la abundancia presente de cada grupo en las dos muestras fue diferente.

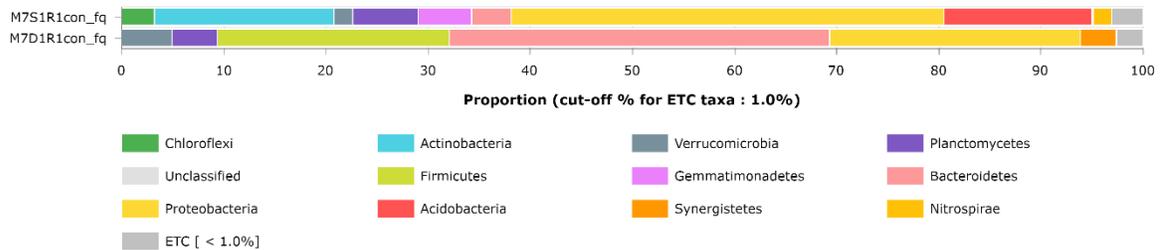


Figura 14. Filos bacterianos presentes en las muestras M7S1 y M7D1.

Para el par de muestras etiquetadas como M9D1 y M9S1, se observan filos presentes en el suelo y ausentes en el intestino de milpiés, tales como Chloroflexi, Planctomycetes, Nitrospirae, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Acidobacteria y Verrucomicrobia. Y los grupos Firmicutes y Synergistetes aparecen solamente en el intestino de milpiés. Los grupos bacterianos que fueron compartidos por ambos son Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Figura 15).

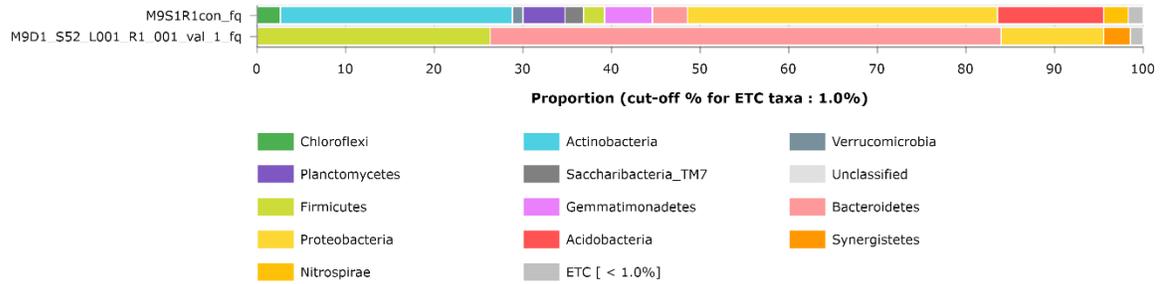


Figura 15. Filos bacterianos presentes en las muestras M9S1 y M9D1.

Para las muestras etiquetadas como M12D1 y M12S1 (Figura 16) se observa que comparten ciertos filos, tales como Firmicutes, Proteobacteria y en menor medida Bacteroidetes, Planctomycetes y Verrucomicrobia. En la muestra procedente de suelo se observa la presencia de Acidobacterias, las cuales no aparecen en el intestino de milpiés de esta muestra.

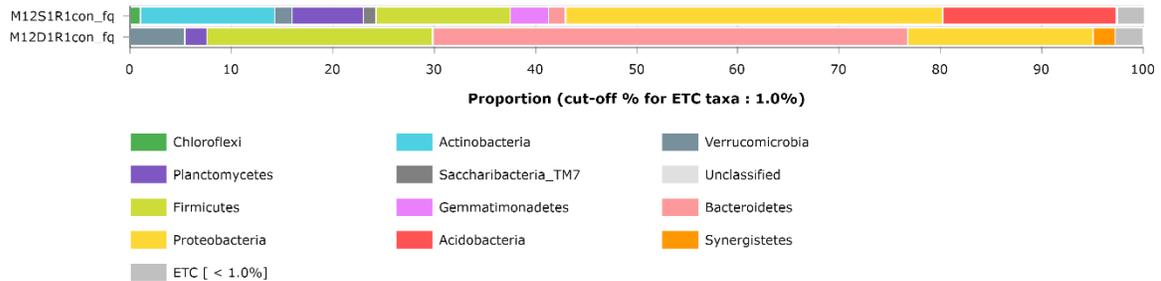


Figura 16. Filos bacterianos presentes en las muestras M12S1 y M12D1.

Para el par de muestras de suelo (L1M2S1) y milpiés (L1M2D1), se observa una gran diferencia entre los grupos más representativos de cada uno, para el caso del suelo Firmicutes aparece en mayor medida y en el intestino de milpiés tiene un porcentaje muy pequeño. En cambio, en la muestra proveniente de milpiés predomina el grupo Proteobacteria, y aunque en suelo también aparece lo hace en menor porcentaje (Figura 17).

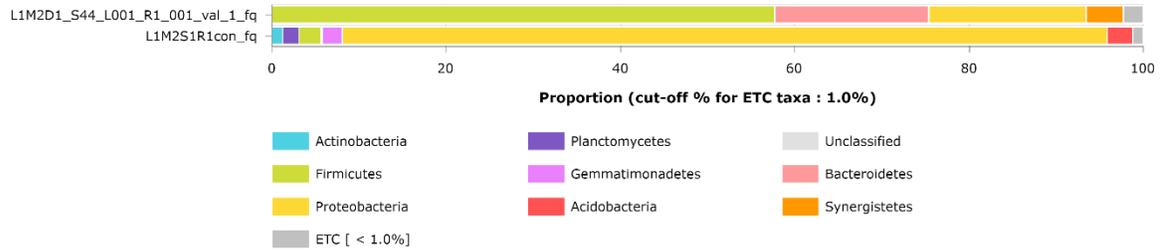


Figura 17. Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2D1 y L1M2S1.

Para las muestras L1M2S4 y L1M2D4 predominan Firmicutes y Proteobacteria en ambos. Bacteroidetes se presenta solo en la muestra de intestino, al igual que Planctomycetes y Elusimicrobia, grupo que no se observa en las anteriores muestras (Figura 18).

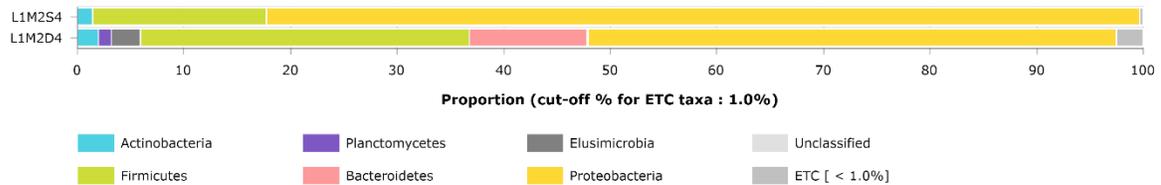


Figura 18. Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2S4 y L1MD4.

Para el último par de muestras de suelo (L1M2S5) y de intestino de milpiés (L1M2D5), se encuentra Firmicutes en ambas, pero en mucho mayor medida en la muestra proveniente de milpiés; además que solo en esta aparece Bacteroidetes y Synergistetes. En la muestra proveniente de suelo se observa Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Actinobacteria, Planctomycetes y Nitrospirae, mismos que no aparecen en la otra muestra (Figura 19).

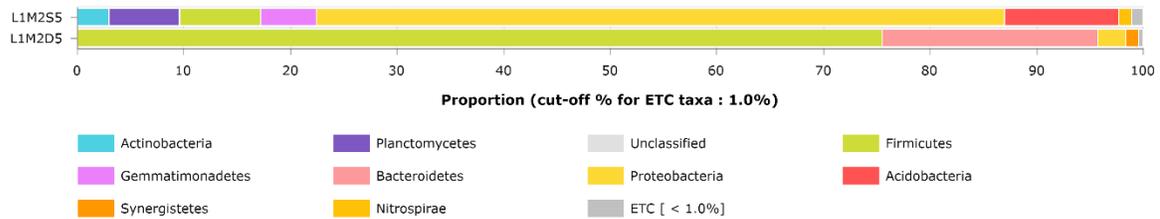


Figura 19. Filos bacterianos presentes en las muestras L1M2S5 y L1M2D5.

En la Figura 20 se indican los resultados del Análisis de Coordenadas Principales, a nivel taxonómico de filo donde se observó que existe separación significativa ($p < 0.05$) de los resultados según el tipo de muestra. En el análisis los dos primeros componentes con criterio de valor propio (> 1) explicaron más del 50% de la variabilidad de los datos, distribuidos en 32% para el primer factor, así como 20% para el segundo, respectivamente.

Las muestras provenientes del intestino de milpiés se agrupan todas juntas del lado derecho del mapa, a excepción de la muestra L1M2D4. En cuanto a las muestras provenientes de suelo se agruparon todas del lado izquierdo del mapa, formando dos grupos, uno con las muestras M7S1, M9S1 y M12S1, y el otro grupo con las muestras L1M2S1, L1M2S4 y L1M2S5.

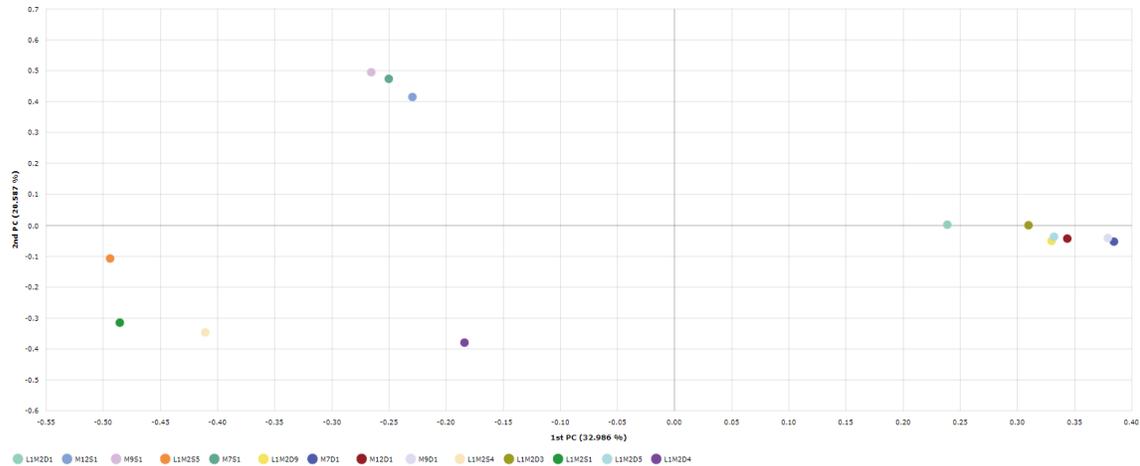


Figura 20. Análisis de Coordenadas Principales de las muestras secuenciadas.

8.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico PERMANOVA confirmó diferencias significativas entre las comunidades bacterianas del suelo y las de intestinos de milpiés, con un valor de p de 0.001 (Figura 21), evidenciando la distinción marcada entre los dos tipos de muestras.

All sets		Pair-wise				
p-value ** (p=0.001)	Sets 2			pseudo-F	p-value	q-value
MTPs 14	No. of permutations 999	Diplopoda	Suelo	7.124	** (0.001)	** (0.001)

Figura 21. Resultados del PERMANOVA

8.11. Diversidad con números de Hill

El número efectivo de OTUs mostró diferencias significativas ($X^2= 14.1$, $p<0.001$) entre las muestras de Diplopoda y suelo según los números de Hill (Figura 22). Se observó que los sitios de suelo M7S1, M9S1 y M12S1 presentaron la mayor riqueza de OTUs a nivel de familia, mientras que en el intestino de diploda fueron las muestras L1M2D3 y L1M2D4. Al comparar

la riqueza de especies efectiva promedio entre muestras de Diplopoda y suelo, se observó que las muestras de suelo presentaron mayor riqueza de especies ($q=0$) y equidad (especies moderadamente abundantes) que Diplopoda (Figura 23 a y b), sin embargo, en los valores de $q = 2$ (el inverso del índice de Simpson) no presentaron diferencia de dominancia entre muestras (Figura 23c).

Por otra parte, a nivel de muestra y promedio se obtuvo que los valores de completitud para cada muestra fueron satisfactorios ya que se obtuvieron valores superiores a 0.9 (Figura 24).

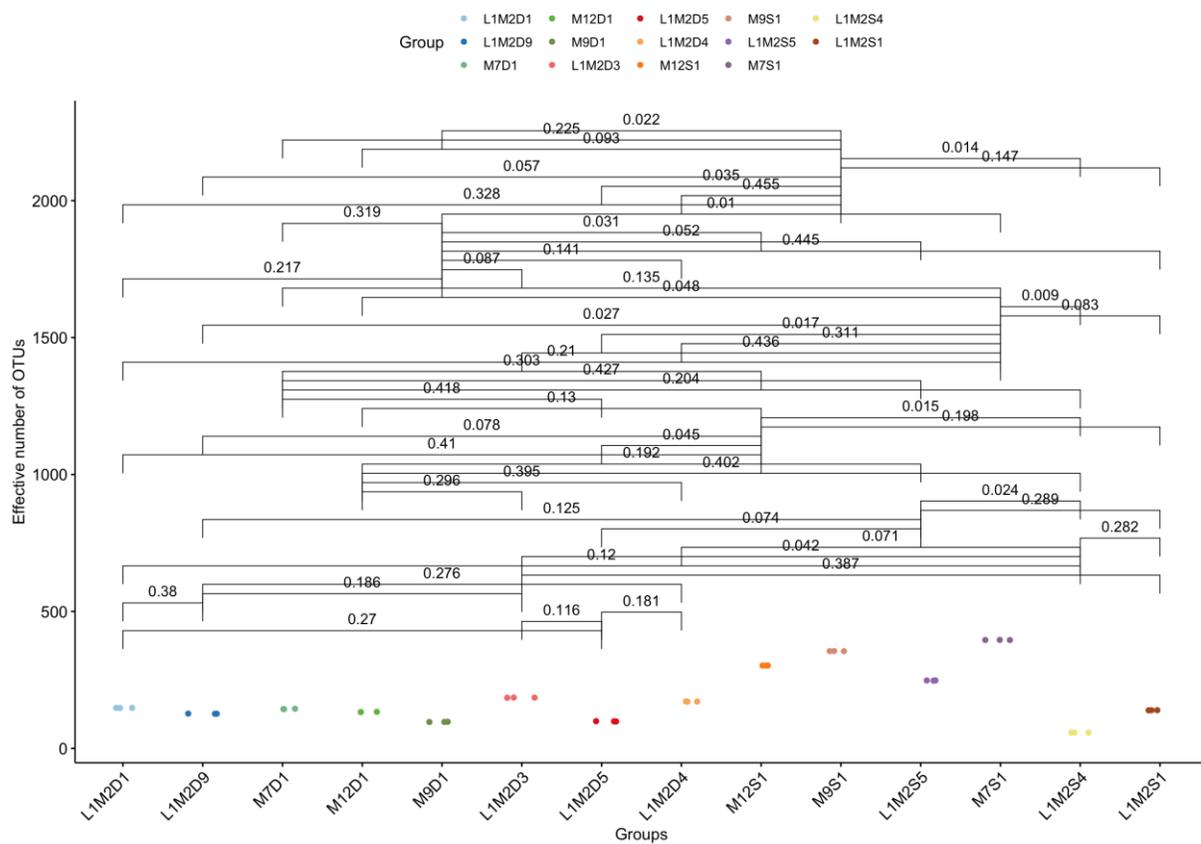


Figura 22. Diversidad de especies a nivel de familia entre muestras de suelo y Diplopoda. Diferencias significativas entre muestras son señaladas por un análisis de Kruskal-Wallis. Para clave de las muestras ver Cuadro 2.

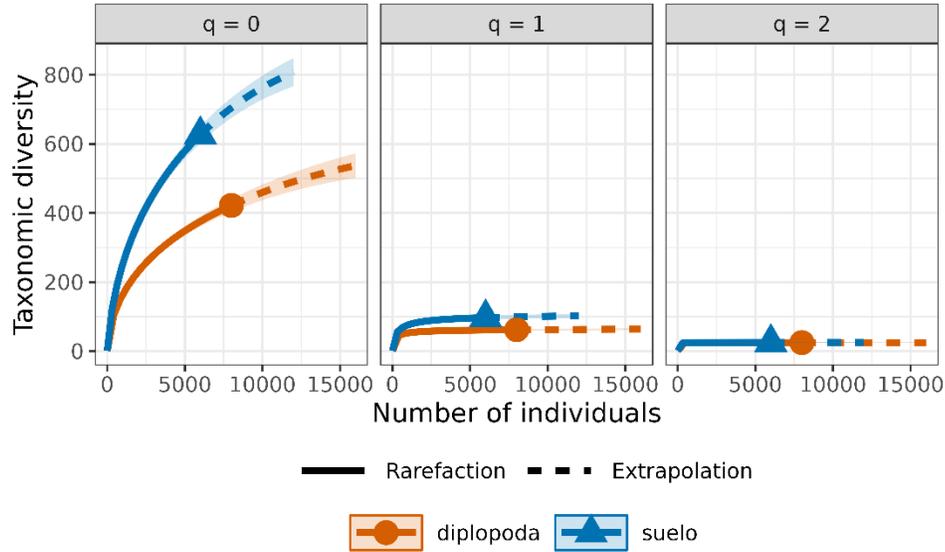


Figura 23. Curvas de interpolación (rarefacción)/extrapolación de la diversidad promedio de especies en muestras de suelo y Diplopoda, con base en los números de Hill: a) $q=0$: riqueza (número efectivo de especies), b) $q=1$: exponente de la diversidad Shannon, c) $q=2$: inverso del índice de diversidad de Simpson. Las bandas corresponden al intervalo de confianza al 95%.

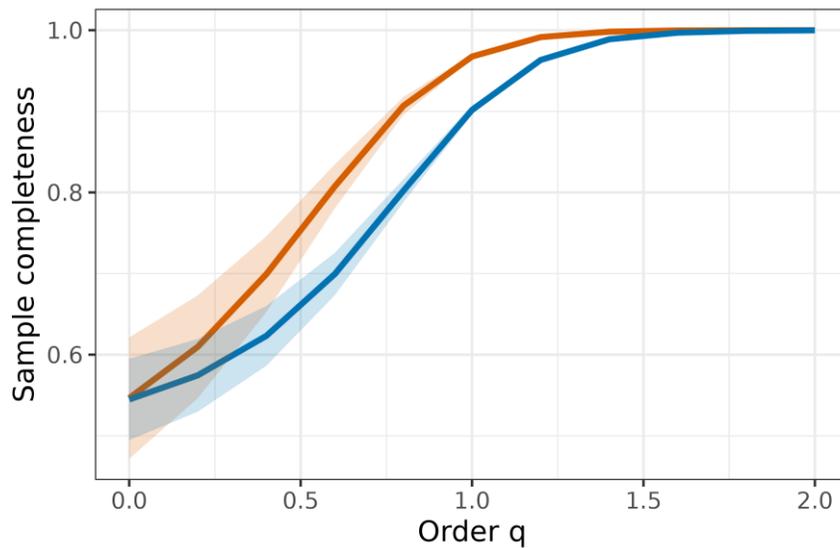


Figura 24. Análisis de la cobertura de la muestra basado en el número de OTUs recolectados en muestras de suelo y Diplopoda. Las bandas corresponden al intervalo de confianza al 95%.

IX. DISCUSIÓN

Este estudio respalda la hipótesis de que la microbiota intestinal de Diplopoda, difiere con la microbiota del suelo, a pesar de que existe una relación entre la microbiota intestinal de milpiés y la microbiota del hábitat de estos, es decir, la microbiota del suelo, las comunidades bacterianas entre ambos grupos serían diferentes (Byzov, 2006). Los grupos bacterianos más representativos encontrados en las muestras de intestino de milpiés fueron Proteobacteria, Firmicutes. Mientras que en las muestras de suelo se encontraron Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria. Estos hallazgos respaldan, además, la idea de que la microbiota intestinal de los milpiés es única y está influenciada por factores específicos del hábitat. En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de comprender la diversidad bacteriana en los ecosistemas terrestres y su relación con la microbiota intestinal de los organismos, lo que puede tener implicaciones significativas en la ecología y la conservación de la biodiversidad.

Metagenómica de bacterias en intestino

En la microbiota del tracto gastrointestinal de milpiés se encontró una gran diversidad de bacterias, algunas relacionadas con procesos metabólicos que tienen que ver con la degradación enzimática de ciertos compuestos que se pueden encontrar en la materia orgánica de la que se alimentan, tal como celulosa, lignocelulosa, entre otros. Este resultado sugiere una relación simbiótica entre hospedero y la microbiota presente, asociada con la degradación de celulosa. Un estudio realizado por Nunez y Crawford (1976), sobre las enzimas digestivas de *O. ornatus* encuentra una mayor actividad de las enzimas analizadas en el contenido intestinal más que en el tejido del animal, lo que sugiere un origen exógeno de enzimas metabólicas, además encuentran presencia de β -amilasas, una enzima de origen estrictamente vegetal o microbiano, por lo que se inferiría que diversos microorganismos mantienen una relación simbiótica con sus

hospederos, en este caso milpiés. La presencia de β -glucosidasas probablemente esté relacionada con la habilidad de los milpiés para utilizar la celulosa como fuente de alimento.

Esto puede ser la razón de la predominancia a nivel de Orden de Clostridiales, un grupo de bacterias que participan activamente en la degradación de celulosa. Uno de los productos finales de la degradación de celulosa por bacterias del género *Clostridium* es el acetato, lo que podría estar relacionado con el hallazgo de Horvathova et al. (2021), donde encuentran que el acetato es el principal producto de la fermentación de milpiés Spirostreptidos, un proceso final de la degradación anaerobia de lignocelulosa. Además, entre los genes ortólogos identificados en las muestras de este origen, el gen K01225 es un gen que participa en la hidrólisis de la celulosa, y según la KEGG ha sido reportado en aves y en muestras de suelo, lo que confirma la presencia de bacterias simbiotes con una actividad enzimática importante para invertebrados detritívoros.

Estudios sobre el microbioma intestinal en artrópodos han mostrado que los filos más abundantes son Proteobacteria, algunos Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes (Jang y Kikuchi, 2020). Además, se encuentra mayor diversidad en aquellos que son omnívoros a comparación de los que son estrictamente carnívoros o herbívoros (Grabowski y Klein, 2017). En las termitas, que han sido de los artrópodos más estudiados, se han encontrado *Lactobacilos*, Enterobacteriaceas y *Staphylococcus* como grupos abundantes (Nardi et al., 2002). Y bacterias relacionadas con la degradación de lignocelulosa, uno de los principales alimentos de las termitas. En concordancia con esto, dentro del intestino de milpiés también se encontraron bacterias que posiblemente sintetizan enzimas que le ayuden a sus hospederos a degradar la celulosa, como microorganismos del Orden Clostridiales, el cual se encontró en abundancia en todas las muestras provenientes de intestino de milpiés.

De manera particular, para una de las muestras de intestino que difiere de todas las demás, al tener menor número de filos y presentar el filo Elusimicrobia, podría haber selección de comunidades bacterianas llevada a cabo por virus, tal como proponen Angel et al. (2023). Angel et al. (2023) encuentran abundancia de caudoviricetes, virus que infectan células procariotas, y asumen que estos virus impactan de manera importante el funcionamiento del intestino de los milpiés, además de conferir una selectividad en los grupos bacterianos que se encuentran en el intestino.

Es importante destacar que dentro de la microbiota proveniente de milpiés se logró identificar a *Pseudomonas_uc*. Las especies de *Pseudomonas* han sido encontradas en el intestino de especies de ciempiés, donde analizan la capacidad insecticida de este género bacteriano (Vega et al., 2021). *Pseudomonas_uc* ha sido propuesta como biorreactiva en relaves mineros de cobre, para evitar el uso de agentes dañinos con el medio ambiente, como el cianuro (Arias et al., 2023); por lo que en futuros estudios podría explorarse este tipo de actividad en esta especie bacteriana que se encontró en el intestino de *O. ornatus*.

Metagenómica de bacterias en suelo

Las comunidades microbianas del suelo pueden tener variaciones con el tiempo dependiendo las propiedades y características del suelo mismo, incluso con el tipo de vegetación circundante; el pH y la cantidad de Nitrógeno presente en suelo pueden ser predictores de las comunidades bacterianas presentes según Zverev et al. (2022).

Dentro de las bacterias que se encontraron en el suelo, el grupo Verrucomicrobia hace mayor aparición en 3 de las 6 muestras de suelo (M7S1, M9S y M12S1), las cuales coinciden en tener la misma fecha de recolección a diferencia de las muestras restantes, esto podría estar

influenciado por los nutrientes disponibles en el suelo en esa fecha más cercana a algunas lluvias de temporada, de acuerdo con Uroz et al. (2013). Además, la abundancia de Verrucomicrobia puede variar entre diferentes perfiles de suelo, ya que se ha reportado como un filo adaptado para obtener fácil acceso a sustratos de carbono, junto con Bacteroidetes y Proteobacteria (Bergamann et al., 2011), por lo que dicha capacidad para acceder a estos sustratos de carbono podría explicar su variabilidad entre diferentes perfiles de suelo (Feng et al., 2019).

Por otra parte, la presencia también de Bacteroidetes en las muestras, puede variar entre diferentes perfiles de suelo, ya que se ha reportado como un filo adaptado para obtener fácil acceso a sustratos de carbono, junto con Proteobacteria y Verrucomicrobia (Bergamann et al., 2011), y que estos procesos son llevados a cabo mayormente en la época de marcadas lluvias donde la vegetación es mayor, ya que estos microorganismos se alimentan de compuestos orgánicos (Guerrero, 2002; Arcos-Torres et al., 2022). De forma interesante, hubo otro filo que solo se observó en estas tres muestras de suelo mencionadas anteriormente, Chloroflexi, el cual es un grupo que en el suelo presenta bacterias adaptadas a sustratos de carbono recalcitrantes y nutrientes inorgánicos. La presencia de estos grupos bacterianos en el suelo puede estar influenciada por diversos factores, como la disminución de la disponibilidad de carbono, factores ambientales y la presencia de otros microorganismos como lo sugieren Bergamann et al. (2011), Brewer et al. (2019) y Arcos-Torres et al. (2022), aspectos que deberán estudiarse a futuro para confirmar causas de este fenómeno en el área de estudio.

A pesar de que en las muestras de suelo se observó un gran número de especies bacterianas, la curva de rarefacción en estas muestras, no se acerca a la asíntota, lo que significa que aún muchas especies no aparecieron en los resultados, a diferencia de las muestras procedentes de intestino de milpiés, donde la mayoría tiende a acercarse a la asíntota. Todo esto puede deberse

a la naturaleza de las muestras, es complicado lograr secuenciar bien muestras ambientales procedentes de suelo. Y las muestras de bacterias intestinales podría ser por la selectividad dentro del intestino del milpiés. Esto ya se ha reportado en otros trabajos donde la obtención de secuencias de bacterias puede ser influenciada por diversos factores, aun cuando se tenga ADN de alta calidad debido a su alta sensibilidad y baja tolerancia a condiciones extremas de las células bacterianas, lo que puede dificultar la obtención de secuencias de bacterias en ciertos ambientes (Hernández-León et al., 2010; Valenzuela-González et al., 2015).

Diferencia entre bacterias de suelo e intestino

Las diferencias en la microbiota entre Diplopoda y suelo, obtenidas en el estudio, son respaldadas por los análisis de Coordenadas Principales que arrojan dos agrupaciones, una con muestras de suelo y otra con las de milpiés. La presencia de ciertas bacterias en suelo puede variar debido a sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, la humedad y temperatura hacen que la presencia de bacterias en suelo varíe entre grupos (Brewer et al., 2019; Arcos-Torres et al., 2022). Por otro lado, en las muestras de intestino es lógico encontrar más homogéneo los grupos de bacterias que se encuentran ahí, ya que el intestino de los invertebrados proporciona un ambiente idóneo para cierto tipo de bacterias (Icaza-Chávez, 2013), ya sea manteniendo un pH adecuado y a la compartimentalización del intestino, esto puede ser debido a la funcionalidad ecológica de las bacterias específicas para la degradación de compuestos como lignina y celulosa (Nardi et al., 2016). Lo que podría sugerir que los milpiés tienen una microbiota intestinal característica y propia, diferente a la encontrada en suelo, del que constantemente se están alimentando, lo cual debería investigarse a futuro, con fines de conservación o potencialidad de usos.

La comparación de la diversidad bacteriana entre las muestras de intestino de milpiés y suelo correspondientes al mismo punto de muestreo reveló diferencias significativas en la predominancia de grupos bacterianos. En las muestras etiquetadas como M7D1 y M7S1, se observó una clara distinción en la composición bacteriana. Algunos filos estuvieron presentes solo en el suelo o el intestino de milpiés, lo que sugiere una influencia selectiva de estos artrópodos en la comunidad bacteriana del suelo circundante. Estos patrones de diferenciación se observaron en otras muestras, como M9D1 y M9S1, donde la presencia de ciertos grupos bacterianos en el intestino de milpiés y su ausencia en el suelo indica una posible relación mutualista o selectiva entre los milpiés y ciertos microorganismos.

La presencia compartida de ciertas bacterias en muestras de intestino y suelo podría estar vinculada a procesos como la dispersión. El movimiento de los milpiés a través del suelo y el consumo de éste, propicia la dispersión de ciertos microorganismos del suelo (Anderson y Bignell, 1980), como se evidencia en el caso de *Pseudomonas*, bacteria encontrada tanto en suelo como en el intestino de ciempiés, un aspecto similar que se reporta en otros grupos (Pérez-Pérez et al., 2018). Se ha documentado que *Pseudomonas* promueve el crecimiento de las plantas y exhibe actividad insecticida en algunos artrópodos. Se ha observado que la presencia de lombrices de tierra estimula bacterias productoras de fitohormonas, y considerando el papel ecológico similar de los milpiés a las lombrices, podría sugerirse que este mecanismo también está presente en los diplópodos (Hol et al., 2013).

Diversidad

La cuantificación del ADN extraído reveló una variabilidad en las concentraciones de ADN genómico entre las muestras. Las concentraciones más elevadas se registraron en las muestras M7D1 y M9D1, mientras que las concentraciones más bajas se observaron en las muestras

L1M2S5 y L1M2D3. Esta variabilidad puede influir en la profundidad de secuenciación y, por lo tanto, en la detección de la diversidad bacteriana en cada muestra. Se llevaron a cabo análisis de curvas de rarefacción para todas las muestras, dividiéndolas en muestras del contenido intestinal de milpiés y muestras de suelo. Estas curvas proporcionaron información esencial sobre si la profundidad de secuenciación fue adecuada para capturar la diversidad de especies potencialmente presentes en cada muestra.

Las muestras del contenido intestinal de milpiés mostraron una tendencia a acercarse a la asíntota en las curvas de rarefacción, lo que sugiere que la profundidad de secuenciación en estas muestras fue adecuada para detectar la mayoría de las especies presentes.

En contraste, en las muestras de suelo, solo algunas muestras alcanzaron la asíntota, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue insuficiente en la mayoría de las muestras de suelo. Esta diferencia en la profundidad de secuenciación entre los tipos de muestras puede influir en los resultados de diversidad bacteriana. Y puede deberse a la complejidad y naturaleza de la muestra, ya que se estima que en el suelo es donde mayor diversidad de microorganismos podemos encontrar.

En lo que fue el muestreo es importante señalar que aquí se trabajó con una cantidad de especímenes muy buena, ya que trabajos de este tipo reportaban resultados con muy pocos individuos, como el caso de Geli-Cruz (2019), donde solo utilizan 2 individuos de la especie *Anadenobolus monilicornis*, además en los trabajos sobre microbiota intestinal en milpiés, muchos toman solo una porción del intestino para los análisis, normalmente el intestino posterior, no contemplando la totalidad de las comunidades microbianas. Para el caso de esta tesis se obtuvieron 13 individuos de *Orthoporus ornatus*, lo cual aporta más datos con los que

comparar. Cabe mencionar que en su mayoría fueron especímenes hembras, solo 3 fueron machos; esto podría deberse a que en su mayoría las hembras salen más a la superficie en busca de alimento (Bueno-Villegas et al., 2004).

En cuanto a la identificación de la especie, de acuerdo con las imágenes de Loomis (1996), los gonópodos observados en los 3 machos son similares a la especie *Orthoporus ornatus*, sin embargo, dentro de la clase Diplopoda, la identificación taxonómica es aún muy controversial, y lo es así también dentro del Orden reportado aquí, por lo que análisis de identificación molecular serían ideales para corroborar que se trate de la misma especie, tanto en machos como en hembras, que en estas últimas no es posible identificar a especie ya que no cuentan con gonópodos con los que se pueda hacer la comparación.

Aunque Quintero-Valenzuela y Miguel-Saucedo (2018) reportan a las especies *Narceus gordanus* y *N. americanus*, en el mismo lugar de muestreo (El Carmen, San Ignacio), durante los muestreos realizados para este trabajo no se localizaron dichas especies, incluso este podría ser un dato apócrifo, ya que este género se encuentra distribuido pobremente en el país y solo en la parte del este y sureste de México. Además de que mencionan que la mayoría de los especímenes colectados se encontraron en estadio juvenil, lo cual podría hacer prácticamente imposible la identificación morfológica a nivel de especie.

En resumen, este estudio proporciona una visión detallada de la diversidad bacteriana en milpiés y suelo, destacando la influencia potencial de estos artrópodos en la composición microbiana del suelo circundante. Estos hallazgos pueden tener implicaciones importantes en la ecología de los milpiés y su papel en la salud del suelo y los ecosistemas. Además, los resultados de los índices de diversidad de Diplopoda en México arrojan luz sobre la distribución geográfica de

estos artrópodos en el país, lo que contribuye al conocimiento científico y la conservación de la biodiversidad.

X. CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado con éxito la microbiota del tracto gastrointestinal de *Orthoporus ornatus* y de su suelo asociado en El Carmen, San Ignacio, Sinaloa. La diversidad y riqueza de especies bacterianas en ambos ambientes destacan la complejidad y adaptación específica de la microbiota a su entorno respectivo.

2. Los análisis metagenómicos evidencian claras diferencias en la composición bacteriana entre el tracto gastrointestinal de *Orthoporus ornatus* y su suelo circundante, lo que podría reflejar adaptaciones específicas de la microbiota a cada ambiente. Esto resalta la importancia de la microbiota en la ecología y la biología de los milpiés.

3. Se destacó la predominancia de filos específicos como Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria en el tracto gastrointestinal, y una diversidad más amplia y dominante de Proteobacteria en el suelo. La diversidad con números de Hill indicó una variación significativa en la riqueza y distribución de especies entre muestras, reflejando una biodiversidad rica y particular en cada entorno.

4. Este estudio contribuye al entendimiento de las interacciones microbianas en ecosistemas específicos y subraya la importancia de estudiar la microbiota en diferentes ambientes para comprender mejor su papel en la ecología de los organismos.

5. La metodología aplicada y los resultados obtenidos ofrecen una base para futuras investigaciones en la caracterización de la microbiota en otros organismos y ambientes, promoviendo una perspectiva más amplia de la biodiversidad microbiana.

6. Se sugiere el seguimiento de estos estudios para examinar los efectos funcionales de estas comunidades microbianas en la salud y el comportamiento de los milpiés y en la calidad y

características del suelo, proporcionando así datos valiosos para la conservación de estos ecosistemas.

XI. PERSPECTIVAS

1. "Caracterización de las interacciones milpiés-bacterias para la salud del suelo"
2. "Análisis de la microbiota intestinal y su impacto ecológico en milpiés"
3. "Monitoreo de la dinámica temporal de comunidades microbianas en milpiés"
4. "Aplicación genómica para desentrañar funciones biotecnológicas en milpiés"
5. "Implementación de la conservación de milpiés a través de la diversidad microbiana"

XII. REFERENCIAS

- Alagesan, P., y Muthukrishnan, J. (2003). Effect of temperature on yolk utilisation and rate of development in *Xenobolus carnifex* (Fabricius) (Diplopoda: Spirobolida). *African Invertebrates*. 44(1), 313-323. doi: 10.10520/EJC84494
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) “Basic local alignment search tool”. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Anderson, J. M., and Bignell, D. E. (1980). Bacteria in the food, gut contents and faeces of the litter-feeding millipede *Glomeris Marginata* (villers). *Soil Biology & Biochemistry*. 12, 251-254.
- Angel, R., Nweze, Julius y Schweichhart. (2023). Viral communities in millipede guts: insights into diversity and the potential role in modulating the microbiome. In B. C. CAS (Ed.).
- Arias, D., Salazar-Ardiles, C., Andrade, D. C., Rivas, M., Panico, A., Race, M., Dorador, C. (2023). The microbial world in copper sulfide flotation plants (CSFP): Novel insights into bacterial communities and their application as potential pyrite bioreagents. *Environmental Research*. 218, 114904. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114904>
- Bahrndorff, S., de Jonge, N., Hansen, J. K., Lauritzen, J. M. S., Spanggaard, L. H., Sorensen, M., H. Yde, M. and Nielsen, J. L. (2018). Diversity and metabolic potential of the microbiota associated with a soil arthropod. *Scientific Reports*. 8(1), 2491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-018-20967-0>

- Baker, G. H. (1980). The water and temperature relationships of *Ommatoiulus moreletii* (Diplopoda: Iulidae). *Journal of zoology*. 190(1), 97-108.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01425.x>
- Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. 2011. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem*. 43(7):1450-1455. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.03.012.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*. 37(8), 852-857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brewer, T. E., Aronson, E. L., Arogyaswamy, K., Billings, S. A., Botthoff, J. K., Campbell, A. N., Kaye, J. (2019). Ecological and genomic attributes of novel bacterial taxa that thrive in subsurface soil horizons. *MBio*. 10(5), e01318-19.
- Bueno-Villegas J. y Cupul-Magaña, F. G. 2020. Catálogo de Autoridades Taxonómicas (CAT) de Myriapoda en México. Centro Universitario de la Costa. Universidad de Guadalajara, Bases de datos SNIB-CONABIO, proyecto KT009. Ciudad de México.
- Bueno-Villegas, J., Sierwald, P., y Bond, J. (2004). Diplopoda. In (pp. 569-599).
- Byzov, B. A. (2006). Intestinal Microbiota of Millipedes. In H. König y A. Varma (Eds.), *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates* (Vol. 6, pp. 89-114). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-28185-1_4

- Cazemier, A. E., Hackstein, J., Op den Camp HJM, Rosenberg, J., y van der Drift C. (1997). Bacteria in the Intestinal Tract of Different Species of Arthropods. *Microbial Ecology*. 33(3), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s002489900021>
- Chao, A., y Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*. 93(12), 2533-2547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/11-1952.1>
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., y Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 11, 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>.
- Cupul-Magaña, F. G. (2014). Registro de las especies de ciempiés (Chilopoda) y milpiés (Diplopoda) de Sinaloa, México. *R. Actualidades Biológicas*. 36, 73-76. <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v36n100/v36n100a9.pdf>
- Dahl, W. J., Rivero Mendoza, D., y Lambert, J. M. (2020). Diet, nutrients and the microbiome. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 171, 237-263. doi:10.1016/bs.pmbts.2020.04.006
- David, J.-F. (2009). Ecology of millipedes (Diplopoda) in the context of global change Jean-François. *Soil organisms*. 81(3), 719.
- David, J.-F., y Gillon, D. (2002). Annual feeding rate of the millipede *Glomeris marginata* on holm oak (*Quercus ilex*) leaf litter under Mediterranean conditions. *Pedobiologia*. 46(1), 42-52. doi: <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00112>

- de Godoy, J. A. P., y Fontanetti, C. S. (2010). Diplopods as Bioindicators of Soils: Analysis of Midgut of Individuals Maintained in Substrat Containing Sewage Sludge. *Water, Air, & Soil Pollution*. 210(1), 389-398. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0261-z>
- Dunger, W., y Voigtländer, K. (2009). Soil fauna (Lumbricidae, Collembola, Diplopoda and Chilopoda) as indicators of soil eco-subsystem development in post-mining sites of eastern Germany – a review. *Soil organisms*. 81(1), 1–51.
- Esposti, M. D., y Romero, E. M. (2017). The functional microbiome of arthropods. *Plos One*. 12(5). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176573>
- Feng, H.; Guo, J.; Wang, W.; Song, X.; Yu, S. 2019. Soil Depth Determines the Composition and Diversity of Bacterial and Archaeal Communities in a Poplar Plantation. *Forests*. 10, 550. <https://doi.org/10.3390/f10070550>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. 3(5), 294–299.
- Geli-Cruz, O., Cafaro, M., Santos-Flores, C.J., Ropelewski, A.J., y Van Dam, A.R. (2019). Taxonomic survey of *Anadenobolus monilicornis* gut microbiota via shotgun nanopore sequencing. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/560755>
- Glukhova, A. A., Karabanova, A. A., Yakushev, A. V., Semenyuk, II, Boykova, Y. V., Malkina, N. D., Efremenkova, O. V. (2018). Antibiotic Activity of Actinobacteria from the Digestive Tract of Millipede *Nedyopus dawydoffiae* (Diplopoda). *Antibiotics-Basel*. 7(4), 14. doi:10.3390/antibiotics7040094

- Golovatch, S. I., y Liu, W. (2020). Diversity, distribution patterns, and fauno-genesis of the millipedes (Diplopoda) of mainland China. *Zookeys*. 930, 153-198. doi:10.3897/zookeys.930.47513
- Golovatch, S. I., Hoffman, R. L., Adis, J., y Demorais, J. W. (1995). Identification plate for the millipede orders populating the neotropical region south of central Mexico (myriapoda, Diplopoda). *Studies On Neotropical Fauna And Environment*. 30(3), 159-164. doi: <https://doi.org/10.1080/01650529509360954>
- Grabowski, N. T., y Klein, G. (2017). Bacteria encountered in raw insect, spider, scorpion, and centipede taxa including edible species, and their significance from the food hygiene point of view. *Trends in Food Science & Technology*. 63, 80-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.007>
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C. y Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton* (Buenos Aires), 79(2), 133-139.
- Hol, W. H. G., Bezemer, T. M., y Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in Plant Science*. 4. doi:10.3389/fpls.2013.00081
- Horvathova, T., Sustr, V., Chronakova, A., Semanova, S., Lang, K., Dietrich, C., Simek, M. (2021). Methanogenesis in the Digestive Tracts of the Tropical Millipedes *Archispirostreptus gigas* (Diplopoda, Spirostreptidae) and *Epibolus pulchripes* (Diplopoda, Pachybolidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 87(15). doi: <https://doi.org/10.1128/aem.00614-21>

- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de gastroenterología de México*. 78(4), 240-248.
- Jang, S., y Kikuchi, Y. (2020). Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Curr Opin Insect Sci*. 41, 33-39. doi:10.1016/j.cois.2020.06.004
- Jarosz, J., y Kania, G. (2000). The question of whether gut microflora of the millipede *Ommatoiulus sabulosus* could function as a threshold to food infections. *Pedobiologia*. 44, 705-708. doi: [https://doi.org/10.1078/S0031-4056\(04\)70083-9](https://doi.org/10.1078/S0031-4056(04)70083-9)
- Joly, F.-X., et al. (2020). Detritivore conversion of litter into faeces accelerates organic matter turnover. *Communications Biology*. 3(1): 660.
- Kitagami, Y., Kanzaki, N., y Matsuda, Y. (2019). First Report of Segmented Filamentous Bacteria Associated with *Rhigonema* Sp. (Nematoda: Rhigonematidae) Dwelling in Hindgut of *Riukiaria* Sp. (Diplopoda: Xystodesmidae). *Helminthologia*. 56(3), 219-228. doi: <https://doi.org/10.2478/helm-2019-0018>
- Knapp, B. A., Seeber, J., Podmirseg, S. M., Rief, A., Meyer, E., y Insam, H. (2009). Molecular fingerprinting analysis of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda). *Pedobiologia*. 52(5), 325-336. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.11.005>
- Knapp, B. A., Seeber, J., Rief, A., Meyer, E., y Insam, H. (2010). Bacterial community composition of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) as revealed by molecular fingerprinting and cloning. *Folia Microbiologica*. 55(5), 489-496. doi: <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0081-y>
- Kolde, R. (2015). Package ‘pheatmap’. R package, 1(7), 790.

- Levy, S. E., y Boone, B. E. (2019). Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 9(7). doi:10.1101/cshperspect.a025791.
- Loomis, H. F. (1966). Descriptions and Records of Mexican Diplopoda. *Annals of the Entomological Society of America.* 59(1)
- Lopez-Bonel, F. (2021). Diversidad de miriápodos en diferentes tipos de vegetación de Sinaloa, México. Universidad Autónoma de Sinaloa, México.
- Lu, J. J., Perng, C. L., Lee, S. Y., y Wan, C. C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 38(6), 2076-2080. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.38.6.2076-2080.2000>
- Magaña, F.G. (2015). Identificación incorrecta de un milpiés (Myriapoda: Diplopoda): un caso de gran aglomeración de individuos en un parque urbano de Los Mochis, México.
- Mallatt, J., Garey, JR. and Shultz, JW. (2004). Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 31, 178-191.
- Mantilla Martinez, M. J. y Torres Sáez, R. G. (2019). Enfoque metagenómico para la caracterización del microbioma de aves corral. *Revisión Revista Colombiana de Biotecnología.* 21, 77-97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.78390>.
- Moreno, Claudia E., Barragán, Felipe, Pineda, Eduardo, y Pavón, Numa P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 82(4), 1249-1261.

- Nardi, J. B., Bee, C. M., y Taylor, S. J. (2016). Compartmentalization of microbial communities that inhabit the hindguts of millipedes. *Arthropod Structure & Development*. 45(5), 462-474. doi: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.08.007>
- Nardi, J. B., Mackie, R. I., y Dawson, J. O. (2002). Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems?. *Journal of insect physiology*. 48(8), 751–763. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(02\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(02)00105-1)
- Nunez, F. S., y Crawford, C. S. (1976). Digestive enzymes of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 55(2a), 141-145. doi:10.1016/0300-9629(76)90082-7
- Nunez, F. S., y Crawford, C. S. (1977). Anatomy and histology of the alimentary tract of the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda: Spirostreptidae). *J Morphol*. 151(1), 121-130. doi:10.1002/jmor.1051510107
- Ortega-avila, R. a. H.-G., G. (2014). Construcción de una librería metagenómica de bacterias simbioses del intestino de insectos mantis. *jovenes investigadores*, 1.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 41(D1), D590-D596. doi:10.1093/nar/gks1219 %J Nucleic Acids Research.
- Quintero-Valenzuela, G. A. y. M.-S., L. A. (2018). Diversidad de miriápodos en el municipio de San Ignacio, Sinaloa. *Sociedad Mexicana de Entomología*. 4, 18-22.

- Rodicio, M. d. R., y Mendoza, M. d. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Rogers, E. E., y Backus, E. A. (2014). Anterior Foregut Microbiota of the Glassy-Winged Sharpshooter Explored Using Deep 16S rRNA Gene Sequencing from Individual Insects. *Plos One*. 9(9). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106215>
- Rzedowski, J., 2006. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4), 406-425.

doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Schwendinger, P.J. y Giribet, G., 2005. The systematics of the south-east Asian genus Fangensis Rambla (Opiliones: Cyphophthalmi: Stylocellidae). *Invertebrate Systematics*. 19, pp. 297-323. <https://tinyurl.com/y9tgkup5>
- Sebastián-Domingo, J.-J., y Sánchez-Sánchez, C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 110, 51-56.
- SEDATU (2014). Atlas de riesgos. San Ignacio, Sinaloa. T. y. U. Secretaría de Desarrollo Agrario. México, Red mesoamericana para la gestión integral de riesgos 119.
- Sevim, V., Lee, J., Egan, R., Clum, A., Hundley, H., Lee, J., Woyke, T. (2019). Shotgun metagenome data of a defined mock community using Oxford Nanopore, PacBio and Illumina technologies. *Scientific Data*. 6(1), 285. doi:10.1038/s41597-019-0287-z

- Sustr, V., Simek, M., Faktorova, L., Mackova, J., y Tajovsky, K. (2020). Release of greenhouse gases from millipedes as related to food, body size, and other factors. *Soil Biology & Biochemistry*. 144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107765>
- Tajovsky, K. (1992). Feeding biology of the millipede *Glomeris hexasticha*. *Ber. nat. Med.* 10. https://www.zobodat.at/pdf/BERI_S10_0305-0311.pdf
- Tamura, K., y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3), 512-526. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P., Smith, E., y McDonald, G. K. (2015). The effect of cation-anion interactions on soil pH and solubility of organic carbon. *European Journal of Soil Science*. 66(6), 1054-1062. doi:10.1111/ejss.12294
- Taylor, E. C. (1982). Role of aerobic microbial populations in cellulose digestion by desert millipedes. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(2), 281-291. doi:10.1128/aem.44.2.281-291.1982
- Uroz, S., Ioannidis, P., Lengelle, J., Cebren, A., Morin, E., Buee, M., y Martin, F. (2013). Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals Differences between the Microbial Communities Inhabiting the Soil Horizons of a Norway Spruce Plantation. *Plos One*. 8(2), Article e55929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055929>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., y Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. 41(4), 297-313.

- van Elsas, J. D., y Boersma, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*. 47(2), 77-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.010>
- Velez, S., et al. (2012). Biogeography in a Continental Island: Population Structure of the Relict Endemic Centipede *Craterostigma tasmanianus* (Chilopoda, Craterostigmomorpha) in Tasmania Using 16S rRNA and COI. *Journal of Heredity*. 103(1): 80-91. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr110>
- Wesener, T. and C. Conrad (2016). Local Hotspots of Endemism or Artifacts of Incorrect Taxonomy? The Status of Microendemic Pill Millipede Species of the Genus *Glomeris* in Northern Italy (Diplopoda, Glomerida). *Plos One*. 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162284>
- Wesener, T., et al. (2015). First results of the German Barcode of Life (GBOL) - Myriapoda project: Cryptic lineages in German *Stenotaenia linearis* (Koch, 1835) (Chilopoda, Geophilomorpha). *Zookeys*. 510: 15-29. <https://doi.org/10.3897/zookeys.510.8852>
- Whiting, M. F., Carpenter, J. C., Wheeler, Q. D., y Wheeler, W. C. (1997). The Stresiptera Problem: Phylogeny of the Holometabolous Insect Orders Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences and Morphology. *Systematic Biology*. 46(1), 1-68. doi: <https://doi.org/10.2307/2413635>
- Xu, Z., Hansen, M. A., Hansen, L. H., Jacquiod, S., y Sørensen, S. J. (2014). Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. *Plos One*. 9(4), e93445. doi:10.1371/journal.pone.0093445

- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., y Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zverev, A., et al. (2022). Microbial features of mature and abandoned soils in refractory clay deposits. *BMC Microbiology*. 22(1).

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Especies bacterianas encontradas en muestras de intestino de *O. ornatus*

	L1M2 D1	L1M2 D9	M7 D1	M12 D1	M9 D1	L1M2 D3	L1M2 D5	L1M2 D4	Total
No identificados	3274	4502	5342	5720	5662	4684	7555	2898	39637
ETC [< 1.0%]	3673	2930	2951	2857	2195	3378	2292	3342	23618
<i>Alistipes</i> _uc	301	720	735	1592	1499	294	689	259	6089
EF404556_g_uc	2125	241	173	156	239	220	132	188	3474
<i>Desulfovibrio</i> _g2_u c	351	1299	1097	215	-	361	-	-	3323
EF404556_g FJ904262_s	1673	136	219	207	244	342	167	240	3228
<i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i> group	-	-	-	-	-	-	-	1890	1890
<i>Bacteroides</i> _uc	-	434	181	-	157	237	-	-	1009
<i>Pseudomonas</i> _uc	-	-	-	-	-	-	-	1008	1008
EF454969_g AB191992_s	-	-	300	-	424	157	-	-	881
<i>Alistipes</i> AB288918_s	-	-	130	-	-	-	740	-	870
HM998908_g HM998908_s	264	-	-	-	-	604	-	-	868
PAC001437_g_uc	-	226	146	123	-	354	-	-	849
PAC000748_g_uc	-	141	-	-	-	580	-	-	721
FJ374189_g_uc	-	-	-	130	477	-	-	-	607
<i>Acinetobacter</i> _uc	-	-	-	-	-	-	-	607	607
PAC001207_g_uc	-	-	-	-	206	329	-	-	535
<i>Alistipes</i> AB234429_s	-	270	-	215	-	-	-	-	485
<i>Parabacteroides</i> _uc	-	288	-	196	-	-	-	-	484
<i>Pseudomonas</i> <i>batumici</i> group	-	-	-	-	-	-	-	440	440
<i>Akkermansia</i> <i>glycaniphila</i>	-	-	239	191	-	-	-	-	430
<i>Tammella</i> _uc	208	123	-	-	-	-	-	-	331
<i>Armantifilum</i> _uc	-	-	-	154	172	-	-	-	326
AB192116_g AB234554_s	-	-	153	-	171	-	-	-	324
PAC001437_g EU466087_s	-	-	-	-	-	321	-	-	321

	L1M2 D1	L1M2 D9	M7 D1	M12 D1	M9 D1	L1M2 D3	L1M2 D5	L1M2 D4	Total
<i>Pseudoflavonifractor</i> <i>r_uc</i>	-	159	-	-	-	139	-	-	298
<i>Anaerotignum_uc</i>	-	-	-	-	-	-	292	-	292
<i>Shewanella</i> <i>xiamenensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	247	247
HQ260945_g_uc	-	-	-	244	-	-	-	-	244
PAC001207_g AB198476_s	-	-	-	-	221	-	-	-	221
<i>Desulfovibrio_g2</i> FJ374255_s	-	213	-	-	-	-	-	-	213
<i>Tannerella_uc</i>	-	-	207	-	-	-	-	-	207
AY571491_g_uc	-	-	-	-	195	-	-	-	195
JN039001_g_uc	-	-	-	-	-	-	-	189	189
EU843993_g_uc	-	182	-	-	-	-	-	-	182
<i>Acinetobacter</i> FJ192400_s	-	-	-	-	-	-	-	156	156
<i>Pantoea_uc</i>	-	-	-	-	-	-	-	143	143
<i>Acinetobacter</i> JF232448_s	-	-	-	-	-	-	-	142	142
AB522119_g_uc	-	-	-	-	138	-	-	-	138
<i>Phascolarctobacteri</i> <i>um_uc</i>	-	136	-	-	-	-	-	-	136
<i>Herbinix</i> GQ133195_s	-	-	-	-	-	-	133	-	133
EF453829_g_uc	131	-	-	-	-	-	-	-	131
U81766_g_uc	-	-	127	-	-	-	-	-	127
PAC001207_g AB234509_s	-	-	-	-	-	-	-	127	127
<i>Stenotrophomonas</i> CP016294_s group	-	-	-	-	-	-	-	124	124

Anexo 2. Especies bacterianas presentes en muestras de suelo.

	M12S1	M9S1	L1M2S 5	M7S1	L1M2S 4	L1M2S 1	Total
ETC [< 1.0%]	3785	5093	3168	5344	712	1812	19914
No identificado	2421	2195	1161	2099	790	634	9300
<i>Pseudomonas</i> _uc	-	-	690	-	1878	1587	4155
<i>Pantoea agglomerans</i> group	-	-	826	-	1929	1329	4084
<i>Pseudomonas batumici</i> group	-	-	695	-	852	764	2311
<i>Acinetobacter</i> _uc	-	-	405	-	388	751	1544
<i>Sphingomonas</i> _uc	264	214	126	-	197	177	978
<i>Bacillus pumilus</i> group	-	-	-	-	713	-	713
<i>Shewanella xiamenensis</i>	-	-	193	-	116	237	546
<i>Acinetobacter</i> FJ192400_s	-	-	100	-	130	254	484
JADL_g_uc	217	142	111	-	-	-	470
<i>Bacillus</i> _uc	260	-	156	-	-	-	416
PAC001874_g_uc	-	-	83	257	-	-	340
<i>Bacillus fumarioli</i> group	229	-	106	-	-	-	335
HM748754_g_uc	316	-	-	-	-	-	316
<i>Stenotrophomonas</i> CP016294_s group	-	-	-	-	129	174	303
<i>Pantoea</i> _uc	-	-	-	-	166	113	279
<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i> group	169	-	-	-	-	-	169
<i>Acinetobacter</i> JF232448_s	-	-	-	-	-	168	168
<i>Rubrobacter</i> HQ397512_s	-	150	-	-	-	-	150
<i>Bacillus megaterium</i> group	146	-	-	-	-	-	146
<i>Acidibacter</i> _uc	-	-	-	127	-	-	127
<i>Bacillus</i> AB695960_s	105	-	-	-	-	-	105
PAC000624_g EU881211_s	-	105	-	-	-	-	105
<i>Tepidisphaera</i> _uc	-	101	-	-	-	-	101
AY281358_g HQ190308_s	-	-	98	-	-	-	98
<i>Rhizomicrobium</i> _uc	-	-	-	90	-	-	90
<i>Bacillus niacini</i>	88	-	-	-	-	-	88
PAC002541_g_uc	-	-	-	83	-	-	83
PAC000624_g GQ472385_s	-	-	82	-	-	-	82

NOMBRE DEL TRABAJO

**Caracterización de la microbiota bacteria
na del tracto gastrointestinal de Orthopo
rus ornatus y suel**

AUTOR

Claudia Patricia Ávila-Gaxiola

RECUENTO DE PALABRAS

19610 Words

RECUENTO DE CARACTERES

110968 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

105 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

5.7MB

FECHA DE ENTREGA

Nov 24, 2023 4:23 PM GMT-7

FECHA DEL INFORME

Nov 24, 2023 4:24 PM GMT-7**● 5% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 5% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)