
PRODUCCIÓN DE SECRECIONES GLUCOSÍDICAS POR *Pontoscolex corethrurus* (ANNELIDA, OLIGOCHAETA) COMO FUENTE DE CARBONO FACILMENTE ASIMILABLE.

PABLO RANGEL SILVA
Departamento de Microbiología,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de
México, Apartado Postal 70-242,
04510, México D.F.

RESUMEN

Las lombrices de sierra producen una cantidad importante de moco intestinal. En la región anterior del tubo digestivo, la microflora es estimulada por el moco y como consecuencia de ello, la materia orgánica compleja es sometida a procesos catalíticos. La estimulación de la microflora está fuertemente relacionada con la liberación de materia orgánica simple en forma hidrosoluble, a partir de los complejos húmicos. La naturaleza de la secreción del conducto digestivo de *Pontoscolex corethrurus*, fue evidenciada mediante métodos histoquímicos y bioquímicos. En el tubo digestivo de esta especie, se identificó una glicoproteína del tipo fucomucina y un compuesto cuya naturaleza química es similar a los glicosaminoglicanos. La producción de moco en las lombrices tropicales es importante dentro de los procesos de humificación y mineralización. Estos organismos emplean gran cantidad de energía en la producción de mucinas, sin embargo, esta energía es compensada por la disponibilidad de una cantidad considerable de compuestos de fácil absorción por el mismo organismo.

ABSTRACT

Earthworms produce an important quantity of intestinal mucus. In the first half of the gut, soil microflora is stimulated and the soil organic matter complex is catalyzed. This stimulation of microflora is closely connected with the exploitation of single watersoluble organic matter. Secretions produced by *Pontoscolex corethrurus* were set in evidence by means of biochemical and histochemical methods. In the secretions of gut are present a glycoprotein of the fucomucine type and a compound which chemical nature is similar to glycosaminglycan. Much energy is spent by earthworms in producing mucines, however, that is compensated with later disponibility of compounds which are easily absorbed. Mucus production in tropical earthworms is important in the humification and mineralization. In this process, microflora is stimulated and soil organic matter is transformed.

INTRODUCCIÓN

Pontoscolex corethrurus es un oligoqueto de amplia distribución en el trópico húmedo, cuya importancia radica en la alta biomasa que aporta en algunos lugares, como es el caso de un pastizal del área de Laguna Verde, Veracruz, donde se observa una población de 147,000 individuos con 30 kg de peso fresco por hectárea (Instituto de Ecología A. C., 1984). *Pontoscolex corethrurus* produce en el tubo digestivo una cantidad importante de moco, cuya producción anual se ha estimado en 50 ton/ha (Lavelle, Rangel y Kanyonyo, 1983).

La naturaleza y función del moco producido por lombrices de tierra es poco conocida; van Gensen (1962), reporta la existencia de dos secreciones de naturaleza glicosídica, elaboradas en tracto digestivo de *Eisenia foetida*, Barois (1962), por su parte, refiere el incremento en la actividad respirométrica del suelo que transita por el tubo digestivo de *P. corethrurus*, finalmente Lavelle, Zaidi y Schaefer (1983), sugieren que el moco intestinal de *Millsonia anomala* puede tener un efecto activador o inhibidor de la microflora del suelo.

En el presente trabajo se determina la composición de las secreciones del tracto digestivo de *Pontoscolex corethrurus*, así como los componentes hidrosolubles del suelo que transita y es excretado por esta especie geófaga del trópico mexicano.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo de organismos.- Los organismos se obtuvieron de un vertisol del área de Laguna Verde, Veracruz, a partir de los primeros 10 cm de profundidad, utilizando individuos clitelados (adultos) de peso aproximado a los 500 mg. El suelo provino del sitio de origen de los organismos, empleando material homogenizado de los 0 a los 10 cm de profundidad. Los cultivos se desarrollaron con suelo humedecido a la capacidad de campo (30% de H₂O) y a 27°C, que corresponde a la temperatura óptima para el buen desarrollo de la actividad de la especie, según Pineda y Hernández (1982).

Materia orgánica hidrosoluble.- La extracción de la materia orgánica hidrosoluble del suelo testigo y de las deyecciones, se realizó a partir de una suspensión suelo: agua 1:10, sometida a 15 lb/pulg² de presión en autoclave durante 60 minutos y posterior precipitación con etanol. La cantidad de materia orgánica hidrosoluble total, se determinó por la diferencia entre el peso seco de una alícuota conocida del extracto y el peso calcinado.

A partir de los extractos hidrosolubles previamente hidrolizados, siguiendo los métodos descritos por Spiro (1960, 1962 y 1966 a, b), Spiro y Spiro (1965) y Johansen *et al.* (1960); se cuantificaron los contenidos de hexosas totales por el método del orcinol (en Montreuil, 1963); hexosaminas por el método de Elson y Morgan (1933); ácidos urónicos por el método del carbazol (en Montreuil, 1963) y compuestos peptídicos mediante el reactivo de Folin (Lowry *et al.*, 1951).

La determinación cuantitativa de las secreciones del tracto digestivo del organismo, se realizó histoquímicamente mediante la aplicación de la tinción PAS (Hotchkiss, 1948); PAS previa acetilación (Lillie, 1954) y azul alciano a pH 1 y 2.4 (Mowry, 1960).

A partir del tejido sometido a la digestión por proteasas de baja especificidad (Spiro, 1966a), se realizó la determinación cualitativa por electroforesis en banda de celogel, sobre soporte acetato y cuantitativa de hexosas, hexosaminas y ácidos urónicos por los métodos arriba descritos para los suelos. Los contenidos de D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y F-fucosa, fueron cuantificados por métodos enzimáticos (Finch *et al.*, 1969) y el ácido N-acetilneuramínico por el método de la sialidasa (Warren, 1959).

El extracto digerido del tejido, se sometió a la elución en gradiente continuo de NaCl en tampón fosfato, a través de una columna de DEAE-celulosa, determinando espectrofotométricamente los picos de mayor absorción de las fracciones eluidas.

RESULTADOS

Materia orgánica hidrosoluble.- El contenido de materia orgánica hidrosoluble total, revela un aumento en el suelo que transitó por el tubo digestivo de *P. corethrus*, en relación al suelo control, observándose en el intestino anterior 179 mg 12.5 de materia orgánica hidrosoluble/ gramos de peso seco, mientras que en la región posterior se cuantificaron 100 mg 8.6. En comparación con los valores encontrados en la tierra control (4.2 mg 0.1), lo anterior representa un incremento considerable de esta fracción hidrosoluble. Por otra parte, el contenido de las deyecciones es similar al encontrado en la región posterior del tubo digestivo (9.38 mg 4).

Los contenidos de carbohidratos, hexosaminas, ácidos urónicos y compuestos peptídicos de la fracción hidrosoluble dialisada contra agua de las deyecciones, en general, son más elevadas que en el suelo control, siendo más significativo el incremento en los carbohidratos y los compuestos peptídicos, con valores para los carbohidratos que van de 810 ug/g de suelo seco en los controles, hasta 1,794 ug 18 en las deyecciones, lo que representa un aumento del 123.9%; mientras que para los compuestos peptídicos, aunque menores los valores, el incremento va de 264 ug 9 en el suelo no ingerido, hasta 625 ug 22 en las deyecciones, siendo en este caso, mayor el incremento porcentual (236.7%).

Las hexosaminas y los ácidos urónicos son los compuestos que presentan las menores variaciones, con valores que oscilan de 250 ug 7 en el control a 347 ug 10 en las deyecciones, en el caso de las hexosaminas. Finalmente, los ácidos urónicos presentan la menor variación con valores de 210 ug 15 en el testigo y de 315 ug 19 en las deyecciones.

Cualitativamente, a nivel del tejido epitelial y a todo lo largo del tubo digestivo, se observe la presencia de una

secreción PAS positiva con intensidad variable, dependiendo de su localización en longitud. El conducto digestivo, en su primer tramo, presenta una alteración tanto morfológica como histológica que corresponde a unas pequeñas estructuras secretoras (glándulas faríngeas), productoras de un fluido sensible al azul alciano a pH 2.4 y con respuesta débil a pH 1. A nivel de la piel se pone de manifiesto un compuesto que reacciona al azul alciano a pH 1 (Tabla 1).

TABLA 1
INTENSIDAD DE LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA DE
LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS DEL TRACTO
DIGESTIVO DE *P. COIUTTHRURUS*, CON DIFERENTE
MÉTODOS DE TINCIÓN.

Organos	AA pH 1	AA pH 2.4	PAS	PAS amil.	PAS acet.	PAS sap.
G. far.	+ -	++	++	++	-	++
G. cal.	+ -	+	-	-	-	-
Buche	-	-	+++	+++	-	+++
I. ant.	-	-	++	+	-	++
I. pos.	-	-	++	+	-	++

G. far.- Glándulas faríngeas G. cal.- Glándulas calcíferas

I. ant.- Intestino anterior I. pos.- Intestino posterior

AA.- Azul alciano

PAS amil.- Reacción PAS posterior a la acción de la amilasa

PAS acet.- Reacción PAS previa acetilación

PAS sap.- Reacción PAS con saponificación posterior a la reacción acetilada.

La identificación cualitativa mediante separación por electroforesis diferenció 5 bandas, de las cuales, una es de naturaleza desconocida, dos migraron como glicosaminglicanos y dos corresponden a compuestos glicopeptídicos. De los dos compuestos que migraron como glicosaminglicanos, uno se desplazó paralelo al ácido hialurónico de referencia, y otro alcanzó un punto cercano al condroitin sulfato AC.

El filtrado de extracto, a través de DEAE-celulosa, evidenció el comportamiento de elución de las diferentes bandas, localizando tres picos máximos de absorción del material separado; uno de 0.1 a 0.2 M NaCl, otro entre 0.35 y 0.4 M, y un tercero después de 0.5 M.

El análisis cuantitativo diferencial de los componentes del extracto del tejido, muestra la existencia de 0.54 umoles de hexosaminas, 1.64 umoles de ácidos urónicos, 2.38 umoles de galactosa y 1.93 umoles de fucosa. Por otra parte, se detectaron 2.46 umoles de sulfato por 2.06 umoles de galactosa+hexosaminas. El ácido N-acetilneuramínico y la D-manosa, no fueron evidenciados, así como la presencia de glucosa antes de la hidrólisis, mientras que, posterior a la misma, se obtuvieron 1.83 umoles.

DISCUSIÓN

El análisis histoquímico denota la presencia de tres compuestos glicoconjugados, uno de ellos neutro y dos de naturaleza ácida, de donde uno de estos últimos puede corresponder a un glicosaminglicano.

Los centros secretores se encuentran bien localizados, correspondiendo a una secreción neutra a las glándulas faríngeas, aunado a un polisacárido ácido que se pone de manifiesto por la fuerte basofilia del tejido. El buche y el resto del tubo digestivo, presentan una secreción neutra, siendo más abundante en el endoepitelio de la luz del buche, concordando estas observaciones con lo reportado por van Gesen (1962) para *Eisenia foetida*.

La reacción débil con el azul alciano a pH 1, sugiere la presencia de un compuesto del tipo glicosaminglicano

sulfatado a nivel de las glándulas faríngeas y calcíferas; finalmente, el peritoneo muestra pequeñas zonas almacenadoras de glicógeno (reacción PAS negativa posterior a la digestión amilásica).

Con base en las observaciones histoquímicas, la caracterización de las unidades de carbohidratos pone en evidencia la existencia de una glicoproteína aparente al tipo fucomucina, por la presencia de galactosa, fucosa y hexosaminas, además de la ausencia de NANA y manosa.

El comportamiento del extracto en la columna de DEAE-celulosa, donde es retenida una fracción y eludina a concentraciones comprendidas entre 0 y 0.5 M NaCl, inclina a confirmar la composición glicoprotéica de la fracción.

Existen evidencias que inclinan a pensar en la presencia de un glicosaminglicano del tipo condroitin sulfato AC, debido a la presencia de ácidos urónicos, hexosaminas y sulfato, una banda separada electroforéticamente sensible a la condroitinasa AC y ABC, y por el comportamiento de elución análogo al que presentan los GAG que son retenidos y se eluyen por concentraciones superiores a 0.5 M NaCl.

La abundante secreción observada a nivel del buche, es concordante con las cifras obtenidas por Lavelle y colaboradores (1983), donde encuentran en el primer medio del tubo digestivo de *P. corethrus* 15.9% de materia orgánica hidrosoluble del suelo ingerido, valores cercanos a lo reportado en el presente trabajo (179 mg/g de suelo seco).

La naturaleza glicopeptídica de esta secreción (glicoproteína del tipo fucomucina), presenta una estructura fácilmente degradable si se considera la gran variedad de enzimas presentes en el suelo, producto de la actividad microbiana. Desde el punto de vista que la mayoría de los microorganismos del suelo son quimio-organótrofos y utilizan como fuente de energía fundamental, los compuestos orgánicos conformados básicamente por hexosas, estas secreciones de tan baja complejidad que presentan enlaces fácilmente fraccionables, representan una fuente de carbono de simple acceso, proveniente de los oligosacáridos presentes que pueden ser incorporados de inmediato a las diferentes vías metabólicas de la microflora edáfica (glucólisis, cadena respiratoria, ciclo tricarbóxico).

Considerando la gran biomasa que representa *P. corethrus* y otras especies de oligoquetos terrestres en los sistemas tropicales y su predominio sobre el resto de los organismos edáficos, es posible asumir que los oligoquetos terrestres juegan un papel importante en algunos procesos edáficos. El aporte de estos sustratos glicoconjugados por *P. corethrus* y su fácil asimilación, pueden ser relevantes dentro de los procesos de mineralización y humificación, al tomar en cuenta la abundancia de este organismo y la cantidad de suelo que transita por el tracto digestivo de este organismo, estimada en 300 ton/ha para la región de Laguna Verde, Veracruz (Lavelle, Rangel y Kanyonyo, 1983).

La microflora, al incorporar las secreciones producidas por *P. corethrus* a sus ciclos metabólicos, aumenta su capacidad catalítica favoreciendo la hidrólisis de los compuestos húmicos, liberando ácidos urónicos, hexosas, hexosaminas y compuestos peptídicos. Otra consecuencia del efecto de estos compuestos glicoconjugados sobre la microflora, puede ser el incremento en la actividad respirométrica de las deyecciones, en relación al suelo control reportada por Barois (1982).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Ecología A. C., con el apoyo del CONACyT. Agradezco al Dr. M. Lamotte, al Dr. P. Lavelle de la Ecole Normale Supérieure de Paris, al Dr. J. Picard y a la Dra. B. Hermelin de la Unidad 181 INSEAM, Francia, por el apoyo brindado.

LITERATURA CITADA

- BAROIS, I., 1982. Interrelations entre *Pontoscolex corethrus* (Oligochete), Microflora et matière organique d' un vertisol du Mexique (Laguna Verde, Veracruz) Reporte DEA. Université de Paris VI, 42 p.
- EILSON, L.A. and W.T.J. MORGAN, 1933. CCXLVIII. A colorimetric method for determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.*, 27: 1824-1828.
- FINCH, P.R., R. YUEN, H. SCHACHTER and M.A. MOSCARELLO, 1969. Enzymic methods for the microassay of

- D-mannose, D-glucose, D-galactose and L-Fucose from acid hydrolyzates of glycoproteins. *Anal. Biochem.*, 31: 296-305.
- HOTCHKISS, R.D., 1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16: 131-141.
- INSTITUTO DE ECOLOGIA, A. C., 1984. Monitoreo ecológico de una planta nucleoelectrica. México, Proyecto CONACyT PCECBNA-001744, 220 p.
- JOHANSEN, P.G., R.D. MARSHALL and A. NEUBERGER, 1960. Carbohydrates in protein. 2. The hexose, hexosamine, acetyl and amide-nitrogen content of hens-egg albumin. *Biochem. J.*, 27: 239-247.
- LAVELLE, P., P. RANGEL and J. KANYONYO, 1983. Intestinal mucus production by two species of tropical earthworms: *Millsonia lamtoiana* (Megascoclecidae) and *Pontoscolex corethrurus* (Glossosoclecidae). In: Ph. Lebrun, H.M., et al. (Eds.), New Trends in Soil Biology. Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve. 405410 pp.
- LAVELLE, P., Z. ZAIDI and R. SCHAEFER, 1983. Interactions between earthworms, soil organic matter and microflora in an african savanna soil. In: Ph. Lebrun H.M., et al. (Eds.), New Trends in Soil Biology. Dieu Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve. 253-259 pp.
- LILLIE, R. D., 1954 Histopathologic technic and practical histochemistry. 2nd Ed. Blakjiston, New York, 34-39 pp.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MONTREUIL, J., 1963. Microdosage des Glucides. Faculté des Sciences de Lille. Lab. á Inst. Rech. Canc. Lille, France. 20-27 pp.
- MOWRY, R.W., 1960. Alcian Blue Tincion. In: Mc. Manus J.F A. R.W. Mowry (Eds.), Staining Methods. Histologic and Histochemical. Hoeber Med. Div., Harper & Row, Publ., New York, 63-64 pp.
- PINEDA, A y J. HERNANDEZ, 1983. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento, con sumo de sierra y fecundidad de la lombriz de sierra *Pontoscolex corethrurus* Muller, 1857 (Oligoqueto-Glossosoclecidae). Tesis ENEP-Iztacala, Univ. Nal. Autón. de México, 56 p.
- SPIRO, R.G., 1960. Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. *J. Biol. Chem.*, 235: 2860-2869.
- SPIRO, R.G., 1962. Studies on the monosaccharide sequence of the serum glycoprotein fetuin. *J. Biol. Chem.*, 237: 646-652.
- SPIRO, R.G., 1966a. Analysis of sugars found in glycoproteins. In: Neufeld, E.F. and V. Gindburg (Eds.). Methods in Enzimology. Academic Press, New York, 3: 3-26.
- SPIRO, R.G., 1966b. Characterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: Neufeld, E.F. and V. Gindburg (Eds.). Methods in Enzimology. Academic Press, New York, 3: 26-52.
- SPIRO, R.G. and M.J. SPIRO. 1965 The carbohydrate composition of the thyroglobulins from several species. *J. Biol. Chem.*, 240: 997-1001.
- VAN GENSEN, P. S., 1962. Structures and functions of the digestive tract of the lumbricid *Eisenia foetida* Savigny. *J. Microscopy*. 1, p. 363.
- WARREN, L., 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 234: 1971-1975.

