



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA AL
INTESTINO DE *Hyperaspis trifurcata*, *Laetilia coccidivora* y
Leucopina bellula DEPREDADORES DE *Dactylopius* spp.
(HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)**

SUSANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

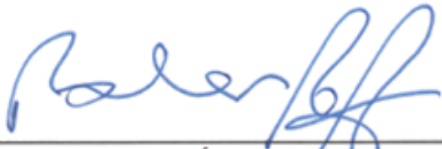



MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2022

La presente tesis titulada: **Diversidad microbiana asociada al intestino de *Hyperaspis trifurcata*, *Laetilia coccidivora* y *Leucopina bellula* depredadores de *Dactylopius* spp. (Hemiptera: Dactylopiidae)** realizada por la alumna: **Susana Martínez Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGIA Y ACAROLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____ DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA
ASESOR	 _____ DR. ARIEL WILBERT GUZMÁN FRANCO
ASESORA	 _____ DRA. MA. TERESA SANTILLÁN GALICIA
ASESOR	 _____ DR. ANTONIO HERNÁNDEZ LÓPEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2022

DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA AL INTESTINO DE *Hyperaspis trifurcata*, *Laetilia coccidivora* Y *Leucopina bellula* DEPREDADORES DE *Dactylopius* spp. (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

**Susana Martínez Martínez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022**

RESUMEN

La simbiosis entre insectos y bacterias intestinales tiene funciones metabólicas específicas como la detoxificación de sustancias de sus hospederos, desdoblamiento de sustancias indigeribles a sustancias más sencillas para su aprovechamiento, o la producción de nutrientes indispensables para completar sus necesidades alimenticias. Se considera que el ácido carmínico en especies de *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae), como *D. opuntiae* y *D. coccus*, participa en su sistema inmune y probablemente contra la depredación. Esto condujo a plantear la hipótesis que los depredadores de *Dactylopius* spp. (el lepidóptero *Laetilia coccidivora*, el coccinélido *Hyperaspis trifurcata* y el díptero *Leucopina bellula*), tienen simbiosis intestinales para metabolizar el ácido carmínico de sus presas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias intestinales asociadas a estos depredadores, y evaluar la posible metabolización del ácido carmínico por dichas cepas bacterianas. Para ello, se aislaron bacterias del intestino de larvas de *Le. bellula* y *L. coccidivora*, y de larvas y adultos de *H. trifurcata*, y se cultivaron en medios de cultivo sólido (LB y R2A) a 30 °C. Las bacterias se identificaron por secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Se aislaron 45 morfotipos bacterianos de las tres especies de depredadores; de éstos, se continuó la experimentación con *Bacillus cereus* y *Enterococcus gallinarum* de larvas de *L. coccidivora*; *Enterobacter* sp., y *Staphylococcus sciuri* de larvas de *H. trifurcata* y *Staphylococcus capitis* del adulto, y *Bacillus pumilus* de larvas de *Le. bellula*. Para evaluar la posible metabolización del ácido carmínico por esas bacterias se empleó el medio líquido (caldo) Zhou y Zimmerman modificado, a éste se le adicionó glucosa y extracto de levadura (fuentes de carbono y nitrógeno), el ácido carmínico e inóculo bacteriano a 3×10^{-8} UFC de cada cepa. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante (120 rpm) a 30 °C; la metabolización (=decoloración) del ácido carmínico se determinó por medio de un espectrofotómetro a las 72 y 168 h. Las seis especies de bacterias metabolizaron del 59 al 100% del ácido carmínico. Es probable que la metodología de este trabajo haya limitado el número de simbiosis que se pudieron aislar de los intestinos de los depredadores, o que participan en la metabolización del ácido carmínico. No obstante, se determinó que los tres depredadores más comunes de *Dactylopius* spp. tienen simbiosis que contribuyen a metabolizar el ácido carmínico de sus presas.

Palabras clave: Cochinilla del nopal, enemigos naturales, ácido carmínico, simbiosis.

**GUT-ASSOCIATED MICROBIAL DIVERSITY OF *Hyperaspis trifurcata*, *Laetilia coccidivora*
AND *Leucopina bellula* PREDATORS OF *Dactylopius* spp. (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)**

**Susana Martínez Martínez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022**

ABSTRACT

The symbiosis between insects and intestinal bacteria have specific metabolic functions such as detoxification of substances from their hosts, breakdown of indigestible substances to less complex substances for their use, or production of essential nutrients to complete their food needs. The carminic acid in *Dactylopius* species (Hemiptera: Dactylopiidae), such as *D. opuntiae* and *D. coccus*, is considered to participate in their immune system and probably against predation. This led to the hypothesis that predators of *Dactylopius* spp. (the moth *Laetilia coccidivora*, the coccinellid *Hyperaspis trifurcata* and the fly *Leucopina bellula*), have intestinal symbionts to metabolize the carminic acid of their prey. The objective of this work was to isolate and identify intestinal bacteria associated with these predators, and to evaluate their possible role in metabolizing carminic acid. For doing this, bacteria were isolated from the gut of larvae of *Le. bellula* and *L. coccidivora*, and larvae and adults of *H. trifurcata*, they were cultivated in solid medium (LB and R2A) at 30 °C. Bacteria were identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene. Forty-five bacterial morphotypes of the three predator species were isolated; of these, experimentation was continued using *Bacillus cereus* and *Enterococcus gallinarum* from larvae of *L. coccidivora*; *Enterobacter* sp., and *Staphylococcus sciuri* from larvae of *H. trifurcata* and *Staphylococcus capitis* from adults, and *Bacillus pumilus* from larvae of *Le. bellula*. The metabolization of carminic acid by these bacteria was evaluated using the modified Zhou and Zimmerman liquid culture medium (broth), to which glucose and yeast extract (carbon and nitrogen sources) were added, carminic acid and bacterial inoculum at 3×10^{-8} CFU of each strain. The cultures were kept under constant agitation (120 rpm) at 30 °C; the metabolization (=discoloration) of carminic acid was determined by a spectrophotometer at 72 and 168 h. The six bacteria species metabolized from 59 to 100% the carminic acid. It is likely that the methodology of this work has limited the number of symbionts that could be isolated from the predators gut, or that participate in the metabolism of carminic acid. However, it was determined that the three most common predators of *Dactylopius* spp. have symbionts that help metabolize carminic acid from their prey.

Key words: Cochineal, natural enemies, carminic acid, symbionts.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, al campus Montecillo y al Posgrado en Fitosanidad, Entomología y Acarología, por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Esteban Rodríguez Leyva. Su apoyo incondicional en todo momento fue un pilar importante, en la adquisición de material y sobre todo en la estructuración del escrito, y por su ejemplo de ética, honestidad y visión.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su apoyo en todo momento y por permitirme trabajar en su laboratorio y sobre todo por sus conocimientos, experiencia y sabiduría.

A la Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia, Dr. Ariel W. Guzmán Franco, Dr. Antonio Hernández López y Dr. Sergio Aranda Ocampo por su apoyo en la revisión del escrito.

Al Dr. José Alberto Urrieta Velázquez por su apoyo y ayuda en todo momento.

A Aracely y Eidann Urrieta por su apoyo todo el tiempo y buenos momentos.

A la M.C Anahí Arely Barrera López por su invaluable amistad y apoyo en todo momento.

Al Dr. Daniel Ochoa Martínez, y Dr. Cristian Nava Díaz por su apoyo y préstamo de reactivos.

Al M.en C. Jorge Valdez Carrasco por su invaluable ayuda en toma de imágenes y por su paciencia.

Al Dr. Lauro Rojas Soto por su apoyo en los análisis estadísticos.

Al Dr. Marcos Soto Hernández y al M.C. Rubén San Miguel Chávez por su apoyo y asesoría en el uso y las lecturas en el espectrofotómetro.

A Silvia Colín Badillo por su amabilidad y ayuda brindada durante mi estancia.

A todos los profesores del área de Entomología por sus conocimientos compartirlos.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CHAPTER 1. BACTERIA ASSOCIATED TO THE INTESTINAL TRACT OF THREE PREDATORS OF <i>Dactylopius opuntiae</i> (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE).....	4
1.1. ABSTRACT.....	4
1.2. INTRODUCTION.....	5
1.3. MATERIALS AND METHODS	7
2.2.1. Predators	7
2.2.2. Isolation of bacterial colonies.....	8
2.2.3. Morphological characterization of bacteria.....	8
2.2.4. Taxonomic placement of bacteria	8
1.4. RESULTS.....	9
1.5. DISCUSSION	13
CAPÍTULO 2. BACTERIAS DEL INTESTINO DE TRES DEPREDAADORES DE <i>Dactylopius</i> spp. (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) ¿PUEDEN ÉSTAS METABOLIZAR EL ÁCIDO CARMÍNICO?.....	16
2.1. INTRODUCCIÓN	16
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.2.1. Cepas bacterianas	18
2.2.2. Solución de ácido carmínico	18
2.2.3. Cultivo en caldo con ácido carmínico	18
2.2.4. Cinética de metabolización del ácido carmínico en medio líquido.....	19
2.2.5. Análisis estadístico	19
2.3. RESULTADOS	19
2.4. DISCUSIÓN.....	21
DISCUSIÓN GENERAL.....	24
CONCLUSIÓN GENERAL	27

LITERATURA CITADA 28

LISTA DE FIGURAS

CHAPTER I

- Figure 1.** Phylogenetic tree of bacteria isolations obtained from *Dactylopius opuntiae* predators: larvae of *Leucopina bellula*, *Laetilia coccidivora* and *Hyperaspis trifurcata* (larvae and adults) and their taxonomic placement to genus and specie based on sequences of the 16s ribosomal RNA gene..... 10

CAPITULO II

- Figura 2.** Metabolización del ácido carmínico a las 72 h por las cepas bacterianas de tres depredadores de *Dactylopius sp*..... 20
- Figura 3.** Metabolización del ácido carmínico a las 168 h por cepas bacterianas de tres depredadores de *Dactylopius sp*..... 20

LISTA DE CUADROS

CHAPTER I

Table 1. Bacterial isolates obtained in this study from three predators of *Dactylopius coccus* and *Dactylopius opuntiae*. Species were determined after phylogenetic analysis of partial 16S sequences. LB = Luria-Bertani broth, R2A = medium with low nutrient concentrations. 11

CAPITULO II

Cuadro 2. Decoloración de ácido carmínico por seis cepas bacterianas recuperadas del intestino de tres depredadores de *Dactylopius* spp. 21

INTRODUCCIÓN GENERAL

La simbiosis entre insectos y microorganismos se conoce desde hace décadas; los insectos albergan diversos microorganismos en el intestino, y las bacterias son el grupo dominante de esa microbiota; los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Tenericutes* se han aislado de la mayoría de Órdenes y tienen funciones muy variadas (Yun *et al.* 2014; Gorrens *et al.* 2021). Algunas tienen un papel fundamental en la fisiología (Augustinos *et al.* 2015; Jang y Kikuchi, 2020), desarrollo, metabolismo, morfogénesis, comportamiento, protección contra depredadores, parásitos y patógenos (Engel y Moran, 2013). En otros, su importancia se relaciona con la inmunidad y producción de feromonas (Rizzi *et al.* 2013), o aprovechamiento de dietas pobres en nutrientes (Engel y Moran 2013). En el último caso, es común que se establezcan simbiosis para compensar carencias nutricionales de la dieta, y se obtengan vitaminas y aminoácidos esenciales (Eleftherianos *et al.* 2013; Flórez *et al.* 2015; Berasategui *et al.* 2016). Por ejemplo, algunos simbiositos (*Buchnera aphidicola*) del áfido *Acyrtosiphon pisum* sintetizan riboflavina y aminoácidos (Douglas 2009; Eleftherianos *et al.* 2013). Las termitas viven en asociación con bacterias degradadoras de lignina (Wernegreen 2012; Hongjie *et al.* 2017; Xu *et al.* 2020) y son un ejemplo clásico de coevolución insecto-simbionte (Yan *et al.* 2021).

La función biológica de la interacción insecto-simbionte para digerir las dietas, absorber nutrientes o producir nutrimentos fue la primera que se comprobó, pero hay otras funciones que se describieron más recientemente (Jang y Kikuchi 2020). Por ejemplo, algunas bacterias intestinales producen enzimas digestivas que degradan compuestos tóxicos como fitotoxinas, plaguicidas, polietileno y colorantes que contribuyen a la adaptación ambiental de sus huéspedes y que, potencialmente, pueden tener aplicaciones prácticas en la industria y cuidado del ambiente (Jang y Kikuchi 2020). Para conocer la microbiota intestinal se usan técnicas como la secuenciación del gen del ARNr 16S (Metataxonómica) y las dependientes del cultivo de cepas en medios sólidos o líquidos (Yun *et al.* 2014; Callegari *et al.* 2020; Gorrens *et al.* 2021).

Recientemente se sugirió que las bacterias simbióticas de *Dactylopius* spp. pueden ser responsables de la formación del ácido carmínico, una hidroxiantraquinona producida por el insecto que se emplea como colorante natural; sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado un vínculo directo entre la presencia o actividad de estos simbiositos con la formación de colorantes (Ramírez-Puebla *et al.* 2010; Kannangara *et al.* 2017; Vera-Ponce *et al.* 2017;

Rasmussen *et al.* 2018). En consecuencia, parece que Dactylopiidae debe ser capaz de sintetizar los colorantes de novo a partir de metabolitos simples como la glucosa presente en la savia del floema de las plantas (Rasmussen *et al.* 2018). Petitpierre (1995) observó que unos escarabajos del género *Timarcha* spp., al alimentarse de su planta huésped *Galium* spp. (Rubiaceae), acumulaban antraquinonas en el estado larval y adulto y esto les proporcionaba protección contra sus depredadores. La acumulación de antraquinonas puede reflejarse incluso en un tercer nivel trófico. Por ejemplo, cuando tres depredadores de *Dactylopius* spp. (un díptero, un lepidóptero y un coccinélido) consumieron su presa éstos adquirieron ácido carmínico y lo usaron como mecanismo de defensa o repelencia contra hormigas depredadoras (Eisner *et al.* 1980, 1994). De estos depredadores dos especies se consideran específicas (*Hyperaspis trifurcata* y *Leucopina bellula*) y tienen preferencia por *Dactylopius opuntiae*, que tiene menor concentración de ácido carmínico (3-5%) que la especie cultivada *D. coccus* (19-25%). El tercer depredador es una larva de lepidóptero, *Laetilia coccidivora*, y tiene la capacidad de alimentarse de las dos especies de *Dactylopius* y otras especies de Pseudococcidae (Flores-Alatorre *et al.* 2014; Barreto-García *et al.* 2020), y de regurgitar ácido carmínico como mecanismo antidepredación (Eisner *et al.* 1980, 1994).

Se considera que la producción de ácido carmínico en insectos del género *Dactylopius* está asociado con su sistema inmune (De La Cruz Hernandez-Hernandez *et al.* 2003) y como un mecanismo antidepredación (Eisner *et al.* 1980, 1994). El ácido carmínico o sus precursores afectan desfavorablemente algunos parámetros biológicos y demográficos de sus depredadores (Barreto-García *et al.* 2020; Trejo-Reyes *et al.* 2021), y es probable que para el aprovechamiento de estas presas (*Dactylopius* spp.) se necesite una microbiota particular en sus depredadores. También es probable que la capacidad de un depredador generalista para alimentarse de la especie de mayor concentración de ácido carmínico pudiera estar influenciada por la misma razón, pues se sabe que la microbiota está involucrada en estos procesos y es afectada por la dieta en otros insectos (Ley *et al.* 2008; Yun *et al.* 2014). El análisis de la diversidad bacteriana dentro de un huésped puede contribuir a mejorar la comprensión del papel ecológico de los simbioses de insectos con sus huéspedes (Gorrens *et al.* 2021), y la interacción también sucede en depredadores y sus presas (Jang y Kikuchi 2020).

La hipótesis que existen simbioses en los depredadores de *Dactylopius* spp., que les permiten alimentarse de esas presas, y que difieren entre depredadores de la especie silvestre o cultivada se soporta en al menos tres hechos: 1.- Hay relativamente un reducido número de depredadores de *Dactylopius* spp. (Vanegas-Rico *et al.* 2010; Barreto-García *et al.* 2020). 2.- Existen bacterias y hongos que metabolizan colorantes (Anand *et al.* 2010; Cortazar Martínez *et al.* 2012; De Almeida *et al.* 2017) como la antraquinona (Prasad 2015; Velayutham *et al.*, 2018), trifenilmetano, tintes azoicos (Deng *et al.* 2008) y reactivo azul 19 (Hai-Hong *et al.* 2019); la metabolización sucede siempre y cuando esas bacterias, generalmente aisladas de manera libre en medios acuosos, tengan una fuente extra de carbono como glucosa, sacarosa, fructosa y de nitrógeno (como extractos de levadura). 3.- Muchos géneros bacterianos tienen la capacidad de metabolizar grupos de colorantes al que pertenece el ácido carmínico (hidroxiantraquinonas). Bajo este contexto, los objetivos de este trabajo fueron: a) Identificar la diversidad de especies bacterianas cultivables asociadas al tracto intestinal de tres especies de depredadores de *D. opuntiae* y *D. coccus* (larvas de *L. coccidivora*, larvas de *L. bellula* y larvas y adultos de *H. trifurcata*); b) Comparar las especies más comunes en un depredador generalista y especialista; c) Determinar si las bacterias aisladas del intestino de los depredadores tienen la capacidad de metabolizar el ácido carmínico.

CHAPTER 1. BACTERIA ASSOCIATED TO THE INTESTINAL TRACT OF THREE PREDATORS OF *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)

1.1. ABSTRACT

Insects depend on gut bacteria for many metabolic functions including detoxification. *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) species (e.g. *D. opuntiae* and *D. coccus*) produce carminic acid possibly acting as part of their immune response to predation; thus predators of *Dactylopius* species may require intestinal symbionts to metabolize carminic acid acquired from their prey. The average content of carminic acid in *D. opuntiae* and *D. coccus* is 3-5% and 19-25% respectively; the predators *Leucopina bellula* and *Hyperaspis trifurcata* are specialists on *D. opuntiae* while *Laetilia coccidivora* feeds on both *D. opuntiae* and *D. coccus*. We determined the diversity of bacteria associated with the gut of these predators to test the hypothesis that it would vary significantly depending on the level of prey specialism. Bacteria were isolated from the intestine of *Le. bellula*, *L. coccidivora* and *H. trifurcata* larvae and also adults of *H. trifurcata*. Bacteria were identified morphologically and by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The greatest bacterial diversity was found in *L. coccidivora* and *H. trifurcata* adults, followed by *H. trifurcata* larvae. The lowest diversity was found in *Le. bellula*. Sequencing revealed the presence of *Bacillus cereus*, *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus* in *L. coccidivora* larvae; *Enterobacter* sp. in larvae of *H. trifurcata*; *Lactococcus lactis* in adults of *H. trifurcata*; and *Staphylococcus* sp. in larvae and adults of *H. trifurcata*. *Bacillus pumilus* was only found in *Le. bellula*. The possible role of these bacteria in the ability of predators to feed on *D. opuntiae* and *D. coccus* is discussed.

Keywords: wild nopal mealybug, bacterial diversity, 16S rRNA.

1.2. INTRODUCTION

Insects have complex symbiotic inter or intracellular associations with various microorganisms [1,2]. These microorganisms can be free in the intestinal lumen or in the body [1]. The microbial community is diverse, but bacteria are the most abundant microorganisms in these associations [3]. The intestine of insects harbours bacteria with specific physiological functions [2,4]; for example, some are responsible for supplementing dietary deficiencies in amino acids and vitamins [5,6]. Many of bacteria that have symbiotic association with insects belong to the families Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonaceae, Staphylococcaceae and Enterococcaceae [7] and produce enzymes that break down natural and synthetic organic molecules into forms that can be assimilated by the host [8]. For example, *Lactobacillus* and *Enterobacteria* in the digestive tract of coleopterans, are important for digestion of celluloses and lignocellulosic compounds [9]. Perhaps one of the most explored bacterial populations is the one associated with the midgut of termites where a great diversity of bacteria associated with the breakdown of lignin or aromatic compounds, and fixation of nitrogen [4,10]. Despite this, interactions between insects and symbionts still represent a largely unstudied [11].

Predator-prey biological model that include carminic acid production by insects in the genus *Dactylopius* have not been studied previously. It is known that the concentration of carminic acid varies between species and stages of development. For example, carminic acid content is 3-5% of the dry weight of *D. opuntiae* but 19-25% of the dry weight of *D. coccus* [12, 13]. It has been suggested that carminic acid is produced as a defence compound within the immune system of *D. coccus* [14], most likely targeted at limiting predation [15,16]. This might account for the limited number of known predators of species in the genus *Dactylopius*. Currently, *D. opuntiae* is considered one of the most important global pests of *Opuntia ficus-indica* (L.) (Caryophyllales: Cactaceae) [17]. *Dactylopius coccus* is also a pest of *O. ficus-indica* although damage and losses are not as important as those caused by *D. opuntiae* [18]. Only in Ethiopia, *D. coccus* has been reported as a highly significant pest [19]. In fact, the economic importance of *D. coccus* in some parts of Mexico is not as a pest but as a source of carminic acid which is used as a natural colourant [20].

Although the anti-predatory effect of carminic acid on natural enemies of *Dactylopius* species has long been suggested, only two specialist predators have been reported, the coccinellid *Hyperaspis*

trifurcata Schaeffer (Coleoptera: Coccinellidae), and the dipteran *Leucopina bellula* Williston (Diptera: Chamaemyiidae); these species use the carminic acid acquired from predation of *Dactylopius* species, to repel predatory ants [15,16]. The generalist predator, *Laetilia coccidivora* Comstock (Lepidoptera: Pyralidae), has also been reported preying on *Dactylopius* species; they excrete the carminic acid when threatened by other predators [15]. The ability to metabolize carminic acid has a fitness cost for predators; carminic acid from the consumption of *D. coccus* has negative effects on the development and reproductive capacity of *L. coccidivora* [13]. Larvae of the specialist predator, *Le. bellula*, have received attention as predators of *D. opuntiae* [21] because they feed on all development stages [17]. Both larvae and adults of the specialist *H. trifurcata* [18], have been associated with *D. opuntiae* in the field and occasionally feed on commercially established colonies of *D. coccus* [20]. This apparent preference for *D. opuntiae* over *D. coccus* could be due to the difference in carminic acid concentrations present in the two species of prey. However, larvae of *L. coccidivora* are one of the most voracious generalist predators of both *D. opuntiae* and *D. coccus*, suggesting that they are not affected by the difference in carminic acid concentration [17]; as a result they can cause considerable losses in commercial production of *D. coccus* [20].

Various studies have demonstrated the ability of bacteria to metabolize dyes, and that the efficiency of this varies amongst species [22]. Some *Bacillus* species have the ability to metabolize dyes such as recalcitrant anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes [23]. *Enterobacter* species are known for their capacity for biodegradation of the anthraquinone group including reagent blue 19 [22]. *Enterococcus* species have the ability to metabolize anthraquinones using carbon sources such as glucose, sucrose and fructose, as well nitrogen sources such as yeast extracts [24]. *Staphylococcus* species have the ability to metabolize anthraquinones [25], and *Lactococcus* can metabolize dyes such as reagent black 5 [26]. Carminic acid is an anthraquinone and all these bacterial genera have the ability to metabolize anthraquinones. Bacterial species within these genera can grow in nutrient-rich culture media such as Luria Bertani [22,27], and R2A, the latter of which is a medium low in nutrients that allows growth of bacteria that are inhibited by high nutrient concentrations [27]. Both media, Luria Bertani and R2A, are frequently used in the isolation of intestinal bacteria from insects [28]. The diversity of bacteria in the intestines of predators is an indicator of the complexity of the assimilation process which can require several steps to metabolize carminic acid.

The preference of *Le. bellula* and *H. trifurcata* for *D. opuntiae* over *D. coccus* in response to lower concentrations of carminic acid (in *D. opuntiae*), and the capacity of *L. coccidivora* to feed on both *D. opuntiae* and *D. coccus* in addition to other insect species, suggests variation in the bacterial community of these contrasting predatory species as a mechanism for differences in prey preference. Based on this, the objective of this study was to compare the diversity of bacterial species associated with the intestinal tract of larvae of *L. coccidivora* and *Le. bellula*, and the larvae and adults of *H. trifurcata*, all predators of *D. opuntiae* and *D. coccus*.

1.3. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Predators

The three species of predators were obtained from laboratory colonies maintained at the Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mexico State. They were fed on different development stages of their natural prey (*D. opuntiae*) ad libitum, according to the methodologies described by Barreto-García *et al.*, [13]. To maintain the natural bacterial diversity of the insects in the colonies, field-collected predators were introduced into the colonies every 10 weeks. Prior to introduction into colonies, field-collected predators were maintained under observation for 15 days, to avoid the introduction of pathogens. Groups of each predator species and developmental stage were established (n = 10 individuals per group): third instar larvae (L3) of *Le. bellula*, fifth instar larvae (L5) of *L. coccidivora*, fourth instar larvae (L4) and adults of *H. trifurcata*. Each group of individuals were then placed in Ziploc® bags and exposed to CO₂ for 20 minutes; all individuals were then transferred to an ethyl acetate chamber for 15 minutes. Subsequently, individuals were surface-sterilized with 1% sodium hypochlorite for 5 minutes, rinsed six times with sterile distilled water, and placed individually onto sterile absorbent paper [29]. Finally, the intestine of each individual was extracted using entomological forceps (No. 5) through a longitudinal cut made with a sterile scalpel. The ten intestines from each group of insects were placed in 100 mL of Luria-Bertani Broth (Dibico, USA) which was incubated at 550 rpm and room temperature for 48 h for *Le. bellula* and *L. coccidivora*, and 72 h for *H. trifurcata*. Differences in incubation time were necessary to achieve sufficient bacterial growth for further analysis.

2.2.2. Isolation of bacterial colonies

Cultures from the Luria-Bertani (LB) broth were logarithmically diluted from 10^{-1} to 10^{-6} . From each dilution, 0.1 ml was inoculated in triplicate into 9 cm Petri dishes of Luria Bertani agar (Dibico, USA) and R2A (Difco, USA) culture media, and distributed with a Digralsky bacterial loop. The plates were incubated at 30 °C until bacterial growth was observed. Bacteria were purified using the cross-streak technique [30] and preserved in 80 % glycerol at -20 ° C prior to evaluation.

2.2.3. Morphological characterization of bacteria

After 24, 48 and 72 h incubation at 30°C bacterial colonies were characterized morphologically using a stereoscopic microscope (Leica Model EZ4, Germany). The form of the colonies was classified as circular, irregular or filamentous, and the margin as undulate, filamentous or entire. The surface or elevation of colonies was considered as flat, convex or umbonate. Pigmentation was categorized as yellow, white, cream or greyish; and the texture as membranous or butyrose, according to the criteria described by Seeley *et al.*, [30].

Microscopic characterization was done using Gram staining according to the protocol described by Seeley *et al.*, [30]. The preparations of each bacterial smear were observed under oil immersion in an optical microscope (Leica Model DM500, Germany) at 100 X objective magnification. All bacterial colonies were classified according to the Gram staining results, and their morphology as cocci, bacilli, coccobacilli or spirals based on the criteria described by Seeley *et al.*, [30].

2.2.4. Taxonomic placement of bacteria

Bacterial identification was achieved by amplifying a region of the 16S gene of the rDNA with the universal primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') [31]. DNA was extraction from pure bacterial colonies using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen®, USA), following the manufacturer's instructions. The quality and quantity of DNA in each sample was verified by spectrophotometry in a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction mix for PCR was prepared in a final volume of 25 µL: 17.37 µL of nuclease-free water (Promega®, USA), 5 µL of 5X Buffer, 0.2 mM of dNTP (Promega®, USA), 0.4 µM of each primer, 1.25 U of DNA

polymerase (Promega®, USA) and 1 µL of DNA (15–25 ng µL⁻¹). Amplifications were made in a Thermal Cycler (BioRad) with an initial denaturation cycle at 95 ° C for 15 min; 30 cycles of 95 ° C for 1 min, 54 ° C for 1 min, an extension at 72 ° C for 2 min; and a final extension at 72 ° C for 10 min [32]. To identify the PCR products, an agarose gel electrophoresis (Promega®, USA) was run and visualized on a transilluminator. The PCR products were sent to Macrogen Inc. (Korea) for direct sequencing.

Sequences were edited using Bioedit v.7.2.5 software [33], and compared with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the basic local alignment tool BLAST implemented in GenBank, as well as with sequences from the European Nucleotide Archive. Based on BLAST analyses, sequences with the highest similarity (e-score closer to zero) to the sequences obtained in this study were retrieved and used as references for identification. Sequences were analysed using Maximum Likelihood analysis based on the Tamura-Nei model with MEGA ver. 5. Software [34]. The robustness of branches was estimated by bootstrap analysis with 1000 repetitions [35].

1.4. RESULTS

A total of 45 bacterial colonies (morphotypes) were obtained from the intestinal tract of the three predators. Of these, 26 were isolated using the LB medium and 19 using the R2A medium (Table 1). There was a large diversity of margin, colour, form and elevation amongst the morphotypes (Table 1). Phylogenetic analysis, all with 100% probability, grouped the 45 morphotypes into eight species distributed amongst five genera, specifically the: genus *Enterobacter* (n = 21); species *Staphylococcus sciuri* (n = 1); species *S. capitis* (n = 2); species *Bacillus cereus* (n = 3); species *B. pumilus* (n = 7); species *Enterococcus gallinarum* (n = 1); species *E. casseliflavus* (n = 1); species *Lactococcus lactis* (n = 9) (Fig. 1).

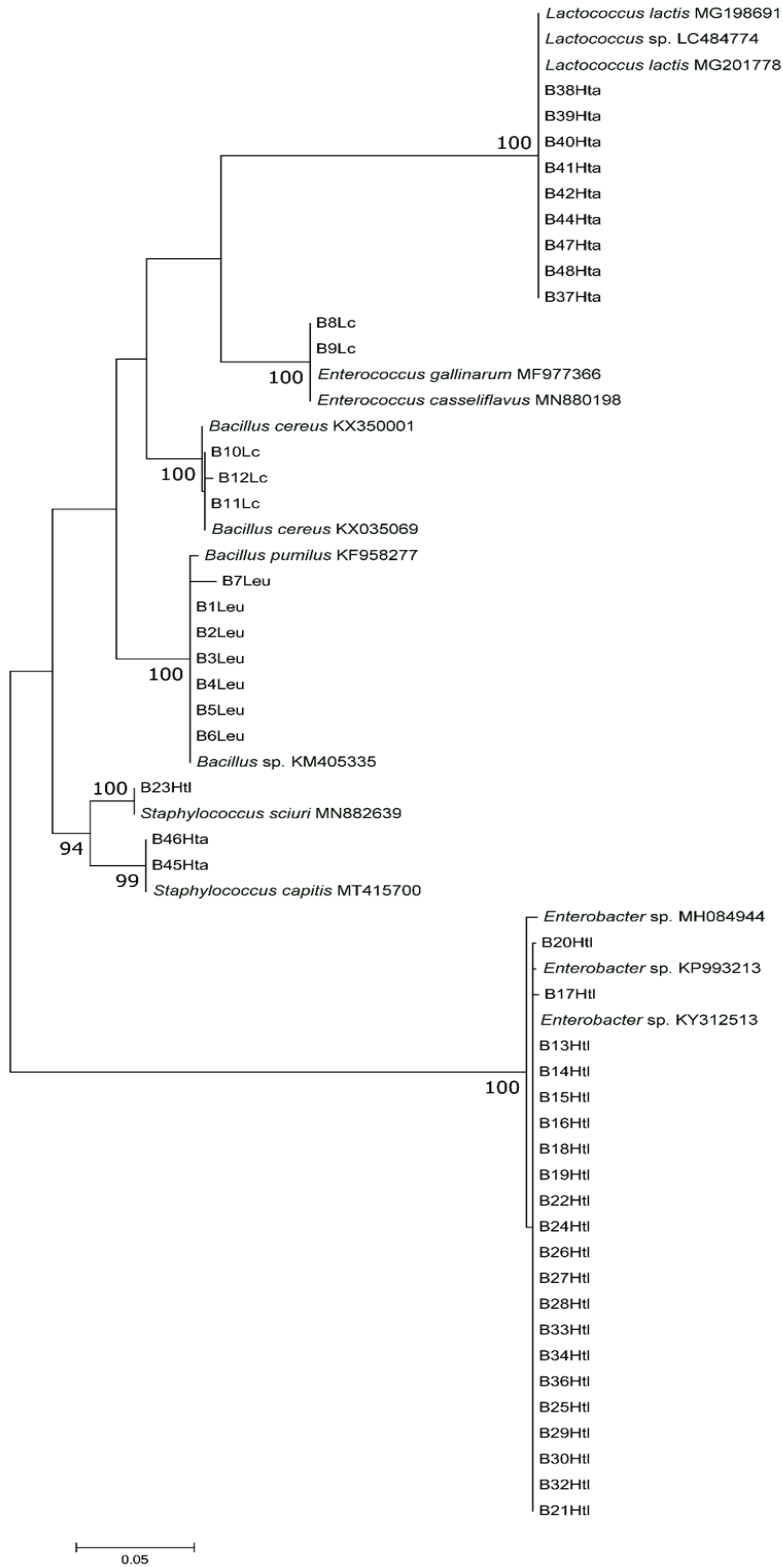


Figure 1 Phylogenetic tree of bacteria isolations obtained from *Dactylopius opuntiae* predators: larvae of *Leucopina bellula*, *Laetilia coccidivora* and *Hyperaspis trifurcata* (larvae and adults) and their taxonomic placement to genus and specie based on sequences of the 16s ribosomal RNA gene

Table 1. Bacterial isolates obtained in this study from three predators of *Dactylopius coccus* and *Dactylopius opuntiae*. Species were determined after phylogenetic analysis of partial 16S sequences. LB = Luria-Bertani, R2A = medium with low nutrient concentrations.

Predator	Isolate	Genus/Species	Medium	Margin	Colour	Form	Elevation	Texture	Gram	GenBank
<i>Leucopina bellula</i> Larvae	B1Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	LB	Undulate	cream	circular	rugose	membranous	+	MW632053
	B2Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	LB	Undulate	cream	circular	rugose	membranous	+	MW632054
	B3Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	LB	Undulate	cream	circular	rugose	membranous	+	MW632055
	B4Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	LB	Undulate	cream	circular	rugose	membranous	+	MW632056
	B5Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	LB	Undulate	cream	circular	rugose	membranous	+	MW632057
	B6Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	R2A	Undulate	white	circular	umbonate	membranous	+	MW632058
	B7Leu	<i>Bacillus pumilus</i>	R2A	Undulate	white	circular	umbonate	membranous	+	MW632059
<i>Laetilia coccidivora</i> Larvae	B8Lc	<i>Enterococcus gallinarum</i>	LB	entire	yellow	circular	convex	smooth	+	MW632060
	B9Lc	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	LB	entire	yellow	circular	convex	smooth	+	MW632061
	B10Lc	<i>Bacillus cereus</i>	LB	entire	white	circular	convex	smooth	+	MW632062
	B11Lc	<i>Bacillus cereus</i>	R2A	filamentous	white	rhizoid	flat	smooth	+	MW632063
	B12Lc	<i>Bacillus cereus</i>	R2A	filamentous	white	rhizoid	flat	smooth	+	MW632064
<i>Hyperaspis trifurcata</i> Larvae	B13Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632065
	B14Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632066
	B15Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632067
	B16Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632068
	B17Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632069
	B18Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632070
	B19Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632071
	B20Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632072
	B21Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632073
	B22Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	white	circular	convex	smooth	-	MW632074
	B23Htl	<i>Staphylococcus sciuri</i>	LB	entire	yellow	circular	convex	smooth	+	MW632075
	B24Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	LB	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632076
	B25Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632077
	B26Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632078
	B27Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632079
	B28Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632080
	B29Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632081
	B30Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632082
	B32Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	rhizoid	convex	smooth	-	MW632083
	B33Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	rhizoid	convex	smooth	-	MW632084
B34Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632085	
B36Htl	<i>Enterobacter</i> sp.	R2A	entire	cream	circular	convex	smooth	-	MW632086	
B37Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	flat	smooth	+	MW632087	
B38Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632088	
B39Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632089	
B40Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632090	
B41Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632091	

Predator	Isolate	Genus/Species	Medium	Margin	Colour	Form	Elevation	Texture	Gram	GenBank
<i>Hyperaspis trifurcata</i>	B42Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	LB	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632092
Adult	B44Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	R2A	entire	cream	circular	raised	smooth	+	MW632093
	B45Hta	<i>Staphylococcus capitis</i>	R2A	entire	white	circular	raised	smooth	+	MW632094
	B46Hta	<i>Staphylococcus capitis</i>	R2A	entire	white	circular	raised	smooth	+	MW632095
	B47Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	R2A	entire	cream	circular	umbonate	smooth	+	MW632096
	B48Hta	<i>Lactococcus lactis</i>	R2A	entire	cream	circular	flat	smooth	+	MW632097

1.5. DISCUSSION

This study is the first description of culturable bacteria from the intestines of the *Le. bellula*, *Laetilia coccidivora* and *Hyperaspis trifurcata*) the most important predators of *Dactylopius opuntiae* and *D. coccus*. The diversity of the bacteria present corresponded with groups known to be capable of metabolizing dyes, pigments and high molecular weight compounds [25]. Therefore, it is likely that the bacteria we found have a functional role in these predators. The diversity of intestinal bacteria found in the generalist predator *L. coccidivora* was greater than the two specialist predators, *Le. bellula* and *Hyperaspis trifurcata*, this could be related to their feeding habits and the ability of *L. coccidivora* to feed on both species of *Dactylopius* regardless of the carminic acid content. The effect of the diet on the composition of gut microbial communities in insects has been widely accepted [36] because they are involved in the metabolism of ingested compounds and in other beneficial metabolic processes [37].

Gut bacteria contribute to the nutrition of insects in different ways; these the production of compounds and enzymes that break down complex molecules into simpler forms that are easier to assimilate, thereby improving digestion [38]. We found *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* in *L. coccidivora*. These two *Enterococcus* species have been reported before as part of the microbiota of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae); both were associated with resistance to various groups of antibiotics including aminoglycosides, streptomycin and kanamycin (*E. casseliflavus*); and streptomycin, neomycin and tetracycline (*E. gallinarum*) [41]. *Enterococcus casseliflavus* is one of the most widely distributed bacteria in Lepidoptera [7]. Many of the known *Enterococcus* species are common symbionts in the intestinal tract of insects and have important functions [42]. Some *Enterococcus* species produce bactericidal substances that selectively target invasive bacteria, but have no effect on ubiquitous members of gut fauna [7]. They can also increase intestinal pH providing the conditions necessary to metabolize complex molecular substances [43]. Similarly, some *Enterococcus* species can metabolize methyl red dye [40] and anthraquinone dye (acid blue 25) [24]; carminic acid is an anthraquinone dye.

We also found *B. cereus* in *L. coccidivora*. This genus is frequently found in the intestines of insects and, in some predators may play an important role in the degradation of carminic acid acquired during feeding on *D. opuntiae*. Some researchers have shown that *Bacillus* species have

the ability to metabolize dyes, for example, one *Bacillus* sp. isolate could metabolize more than 98% of the toxic azo dye methyl red it was provided with [39]. Furthermore, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *B. megaterium* could metabolize 50–60% of the Congo red, Bordeaux and blue dyes they were provided with [40]. We suggest that this is why *B. pumilus*, the only species found in *Le. bellula* larvae, could be related to metabolism of carminic acid.

We found *Enterobacter* sp. and *S. sciuri* in *H. trifurcata* larvae. *Enterobacter* species are known to assimilate phenolic compounds and metabolize anthraquinones, such as reagent blue 19 [22,44].

We only found *S. sciuri* in the larval stages of *H. trifurcata*, although it has also been found in larvae of the beetle *Anoplophora chinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) [2]. It has been reported that *S. sciuri* can metabolize remasol bright blue dye via secretion of enzymes such as laccase, manganese and lignin peroxidase [25].

We found *La. lactis*, and *S. capitis* in *H. trifurcata* adults. Previous reports showed that members of *Lactococcus* produce lactic acid, hydrogen peroxide, diacetyl, carbon dioxide and bacteriocins with antimicrobial activity activity [36, 45]. *Lactococcus* species also metabolize dyes such as reagent black 5 (> 99% in 5.5 h) [26]. The genus *Staphylococcus* has been isolated from other insects such as *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), and has been shown to break down insecticides [8] and metabolize dyes [25]. *Staphylococcus* species have been found in larvae and adults of *Anoplophora chinensis* Thomson (Coleoptera: Cerambycidae) [2], which is in line to our findings. As they are present throughout the entire life cycle, this suggests that these microorganisms have a beneficial function for the insect. We suggest that, finding bacteria from the genus *Staphylococcus* in larvae and adults of *H. trifurcata*, is strongly correlated with their role as a top predator; both developmental stages evaluated feed on more than one developmental stages of *D. opuntiae*, including partial consumption of gravid females.

In conclusion, bacterial diversity found in the generalist predator *L. coccidivora* (larvae) was greater than in the two specialist predators, *Le. bellula* (larvae) and *H. trifurcata* (larvae and adults). Bacterial species isolated from the intestinal tract of the three predators of *Dactylopius*, are known to be capable of metabolizing anthraquinone dyes, to which carminic acid belongs, suggesting a relationship between the capacity to metabolize carminic acid and the diversity of bacteria in the gut of specialist and generalist predators. Our methods enabled identification of

culturable bacterial species; this is important because it will allow us to determine the ability of these bacteria to metabolize carminic acid experimentally. Additional studies should also focus on identifying bacterial species that are not culturable as these could also have an important role in the metabolism of carminic acid.

CAPÍTULO 2. BACTERIAS DEL INTESTINO DE TRES DEPREDADORES DE *Dactylopius* spp. (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) ¿PUEDEN ÉSTAS METABOLIZAR EL ÁCIDO CARMÍNICO?

2.1. INTRODUCCIÓN

Los insectos establecen interacciones simbióticas con microorganismos para aprovechar los recursos alimenticios (Augustinos *et al.* 2015), y en estas simbiosis las bacterias son el grupo dominante en el aparato digestivo (Hongoh 2010; Engel y Moran 2013; Rozadilla *et al.* 2020). A esta microbiota se le considera catalizadora primaria de nutrientes, debido a la gran cantidad de enzimas necesarias para metabolizar compuestos inaccesibles o tóxicos en los alimentos de sus huéspedes (Douglas 2009; Engel y Moran, 2013; De Almeida *et al.* 2017; Sivakumar *et al.* 2017).

La microbiota intestinal (simbiontes) de insectos tiene una relevancia increíble en el aprovechamiento de sus plantas huéspedes (Hongoh 2010; Engel y Moran 2013; Augustinos *et al.* 2015), o en la metabolización de compuestos de defensa y hasta de algunos insecticidas (De Almeida *et al.* 2017; Sivakumar *et al.* 2017; Gilbert 2020). También se ha documentado la importancia de esa microbiota en insectos xilófagos (Xu *et al.* 2020) y hematófagos (Eleftherianos *et al.* 2013) para el aprovechamiento de sus dietas (Douglas 2009; Eleftherianos *et al.* 2013). Esa microbiota puede adaptarse a cambios en la dieta por inducción de enzimas o cambios poblacionales en la comunidad microbiana (De Almeida *et al.* 2017; Sivakumar *et al.* 2017), varias de esas enzimas son producidas por bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae y Enterococcaceae (Paniagua-Voirol *et al.* 2018). La diversidad de la microbiota puede ser indicador de la complejidad de procesos que se necesitan para aprovechar sus dietas; por ejemplo, la degradación de compuestos aromáticos o ligninas (Sivakumar *et al.* 2017; Callegari *et al.* 2020; Xu *et al.* 2020). Para que las bacterias anaeróbicas o aeróbicas puedan degradar sustancias complejas, incluidos los colorantes, necesitan fuentes adicionales de carbono y nitrógeno (Aruna *et al.* 2015; Hai-Hong *et al.* 2019). En algunos trabajos experimentales de laboratorio estas fuentes de carbono y nitrógeno se pueden proporcionar en los medios de cultivo; por ejemplo, el medio Zhou y Zimmermann modificado (ZZ) (Aruna *et al.* 2015; Prasad 2015).

A pesar de la evidencia del papel relevante de los simbiontes en insectos herbívoros, xilófagos u hematófagos, la referencia de simbiontes en insectos depredadores para aprovechar sus

presas es menos frecuente (Polin *et al.* 2015; Park *et al.* 2018). La relación coevolutiva de los insectos del género *Dactylopius* spp. (Hemiptera: Dactylopiidae) y sus depredadores puede proporcionar un modelo útil para documentar ese tipo de simbiosis. *Dactylopius* spp. es un grupo monogénico que produce ácido carmínico (hidroxiantraquinona), una sustancia que se explota como colorante natural (Dapson 2005; Rasmussen *et al.* 2018). Esta sustancia participa en el sistema inmune de estos insectos (De La Cruz Hernandez-Hernandez *et al.* 2003) y más comúnmente se relaciona como un mecanismo antidepredación (Eisner *et al.* 1980; Eisner *et al.* 1994; Barreto-García *et al.* 2020). La existencia de un número relativamente escaso de insectos depredadores de ese género (Vanegas-Rico *et al.* 2010), el bajo porcentaje de sobrevivencia de otros depredadores que se alimentan de especies de *D. opuntiae* (Pacheco-Rueda *et al.* 2011) y el efecto desfavorable en parámetros biológicos y demográficos de dos de sus depredadores más comunes, el especialista *Hyperaspis trifurcata* (Coleoptera: Coccinellidae) y el generalista *Laetilia coccidivora* (Lepidoptera: Pyralidae), cuando se alimentaron de *Dactylopius coccus* (la especie que tiene mayor concentración de ácido carmínico 19-25%), pueden respaldar la hipótesis del ácido carmínico como mecanismo antidepredador (Barreto-García *et al.* 2020; Trejo-Reyes *et al.* 2021).

Con estos antecedentes se formuló la hipótesis que los depredadores de *Dactylopius* spp. albergan simbiontes microbianos en su intestino, y éstos tienen capacidad para metabolizar el ácido carmínico. Esta propuesta se soporta al menos en dos hechos, a) Se aislaron e identificaron varias especies de bacterias del intestino de tres depredadores comunes de *Dactylopius* spp. (Capítulo dos de esta tesis); y b) Algunas bacterias de géneros similares tienen la capacidad de metabolizar colorantes del grupo de las antraquinonas; por ejemplo: *Bacillus* sp. (Deng *et al.* 2008), *Enterobacter* sp. (Hai-Hong *et al.* 2019), *Enterococcus* sp. (Prasad 2015) y *Staphylococcus* sp. (Velayutham *et al.* 2018). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar si las bacterias *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus capitis*, *S. sciuri* y *Enterobacter* sp., aisladas del intestino de tres depredadores de *Dactylopius* spp. pueden metabolizar el ácido carmínico.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Cepas bacterianas

Se aislaron seis cepas del intestino de tres depredadores (*Le. bellula*, *L. coccidivora* e *H. trifurcata*) de *Dactylopius* spp., siguiendo la metodología descrita en el Capítulo dos de este trabajo. Las bacterias *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus capitis*, *S. sciuri* y *Enterobacter* sp. se caracterizaron morfológicamente y se identificaron por la amplificación y secuenciación parcial del gen 16S ARN. Una vez aisladas y purificadas se preservaron a -20 °C en tubos criogénicos con glicerol al 80% (Capítulo 2).

2.2.2. Solución de ácido carmínico

El ácido carmínico que se utilizó en los ensayos fue grado reactivo (Meyer®). Se pesaron y disolvieron 1.052 g de colorante en polvo en 100 mL de agua destilada estéril. La solución se homogeneizó y se filtró en un recipiente estéril, con esto se obtuvo una solución de 10,000 ppm; esta solución se usó posteriormente para adicionar al medio de cultivo sólido para la realización de algunos ensayos preliminares. La longitud de onda máxima del ácido carmínico fue de 494 nm (Stapelfeldt *et al.* 1993).

2.2.3. Cultivo en caldo con ácido carmínico

Para evaluar la posible metabolización del ácido carmínico, por las cepas bacterianas, se utilizó medio líquido Zhou y Zimmerman modificado (Prasad 2015), al cual se le adicionó ácido carmínico. El medio líquido estuvo compuesto por sulfato de amonio (NH₂SO₄) 0.5 g/L, fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 2.66 g/L, fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 4.32 g/L, glucosa 5 g/L y extracto de levadura 1 g/L, a un pH de 7.0 (Aruna *et al.* 2015; Prasad 2015).

Para la preparación del medio líquido (caldo), primero se colocó el caldo Zhou y Zimmerman modificado (Prasad 2015) en matraces de cristal con 97 mL, se esterilizó, una vez frío se le adicionó el ácido carmínico a 100 ppm, se agitó y después se inoculó 1 mL de suspensión bacteriana de cada una de las cepas con 3x10⁸ UFC/mL. Los tratamientos fueron el resultado de las seis especies de bacterias a una concentración de ácido carmínico (100 ppm). El testigo fue el medio de cultivo líquido con colorante (sin inóculo de ninguna cepa bacteriana), que también sirvió para calcular la longitud de absorbancia máxima, y un blanco adicional que sólo fue el medio

líquido sin colorante (Salazar y Castellanos 2018). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Los matraces se colocaron en un agitador orbital Shaker a 120 rpm a 30° C durante siete días.

2.2.4. Cinética de metabolización del ácido carmínico en medio líquido

Para el análisis de la metabolización del ácido carmínico, el matraz se agitó y se tomó una alícuota de 5 mL en un tubo estéril, y éste se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4° C (para separar células y sobrenadante). El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se colocó 1 mL en cada una de las celdas del espectrofotómetro UV-Vis para líquidos (Spectronic Genesys 5®). De cada muestra se hicieron tres mediciones de absorbancia, a una longitud de onda de 494 nm en tres intervalos de tiempo (0, 72 y 168 h) (Karim *et al.* 2018). El mismo procedimiento se realizó para el testigo (sin cepa bacteriana) y el blanco. Para estimar el porcentaje de decoloración del ácido carmínico en cada tratamiento se utilizó la fórmula siguiente.

Decoloración (%) = $\frac{A_o - A_c}{A_o} \times 100$ donde:

A_o

A_o : Absorbancia inicial

A_c : Absorbancia posterior al tratamiento

2.2.5. Análisis estadístico

Para evaluar las variables de interés, concentración de ácido carmínico (CAC) y porcentaje de decoloración (PDD), primero se validaron los supuestos de normalidad, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey, 0.05). Adicionalmente, los datos se ajustaron a una regresión entre la concentración de ácido carmínico y el porcentaje de decoloración. Los análisis se realizaron con el programa R Core Team, R versión 4.0.5

2.3. RESULTADOS

Las bacterias aisladas de los intestinos de los tres depredadores de mayor importancia de *D. opuntiae* y *D. coccus* decoloraron el ácido carmínico en el medio líquido (caldo) Zhou y Zimmerman enriquecido (fuentes extra de carbono y nitrógeno). En este medio las bacterias presentaron metabolización a las 72 y 168 h en condiciones de agitación, y se encontró una relación muy estrecha entre la decoloración y la disminución del ácido carmínico ($R^2 = 0.995$) (Fig. 2 y 3).

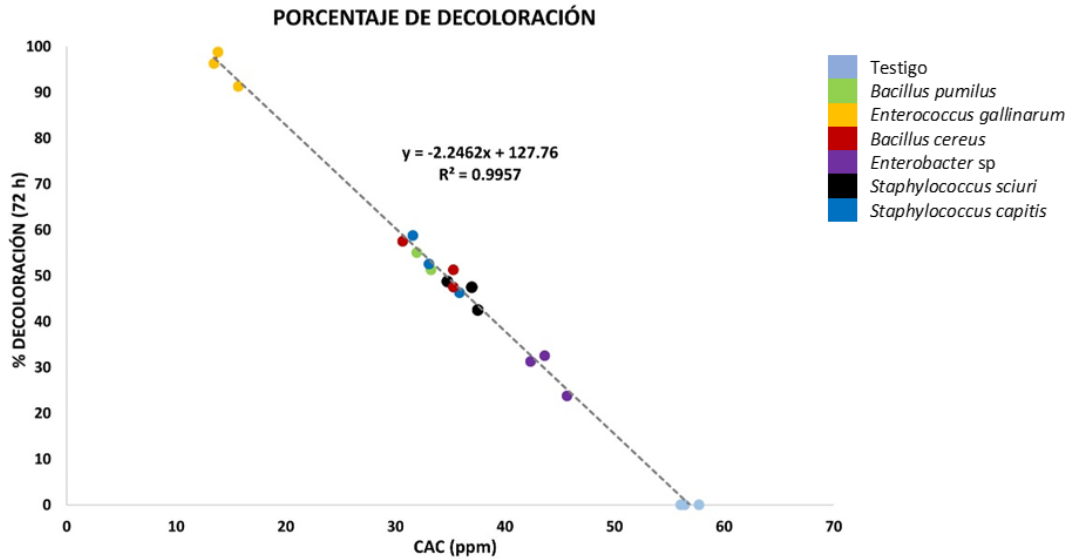


Figura 2 Metabolización del ácido carmínico a las 72 h por las cepas bacterianas de tres depredadores de *Dactylopius sp.*

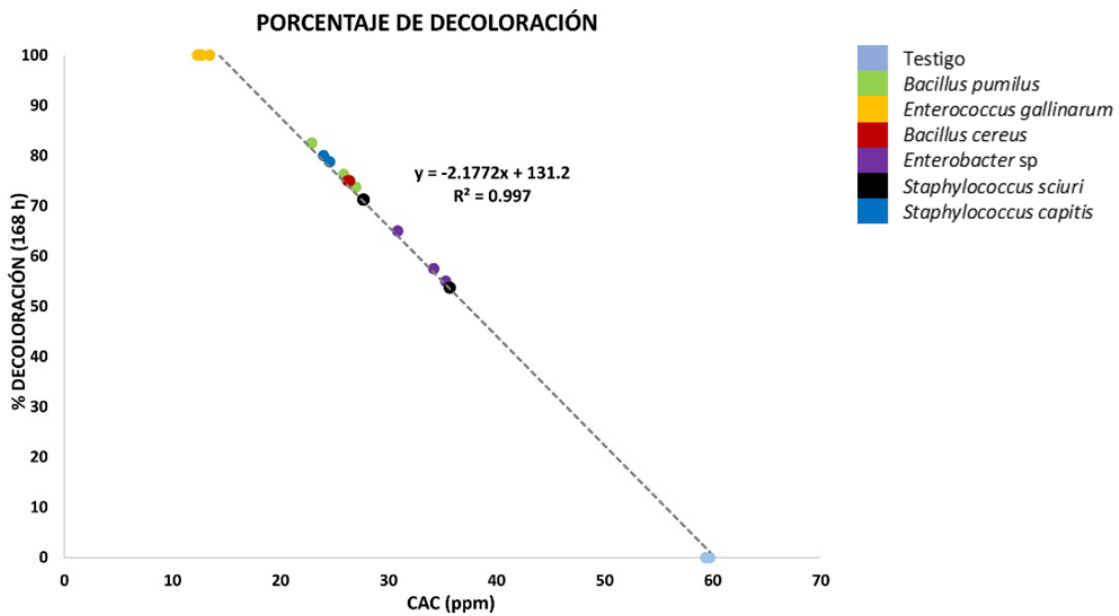


Figura 3 Metabolización del ácido carmínico a las 168 h por cepas bacterianas de tres depredadores de *Dactylopius sp.*

La metabolización expresada como decoloración en el medio líquido (caldo) tuvo diferencias significativas a las 72 h ($\alpha < 0.0001$) y 168 h ($\alpha < 0.0001$). A las 72 h *E. gallinarum* fue la especie con mayor actividad de decoloración (95.42 %), seguida por las cepas de *B. cereus*, *B. pumilus*, *S. capitis* y *S. sciuri* con porcentajes de decoloración entre 46 y 52%; *Enterobacter sp.*

registró el menor porcentaje de decoloración (29.1%) (Cuadro 2). El porcentaje de decoloración se incrementó a las 168 h en todas las cepas. En este periodo todas las cepas lograron decoloración mayor al 59%, y una cepa en particular, *E. gallinarum*, logró decolorar el 100 % (Cuadro 2).

Cuadro 2. Decoloración de ácido carmínico por seis cepas bacterianas aisladas del intestino de tres depredadores de *Dactylopius* spp.

Origen de la cepa bacteriana Depredador	Cepas bacterianas	Decoloración (%)	
		72 h	168 h
<i>Laetilia coccidivora</i> -larva	<i>Enterococcus gallinarum</i>	*95.42 a	*100 a
<i>L. coccidivora</i> -larva	<i>Bacillus cereus</i>	52.5 b	79.58 b
<i>Leucopina bellula</i> -larva	<i>Bacillus pumilus</i>	52.5 b	77.5 bc
<i>Hyperaspis trifurcata</i> -adulto	<i>Staphylococcus capitis</i>	52.08 b	77.5 bc
<i>H. trifurcata</i> -larva	<i>Staphylococcus sciuri</i>	46.25 b	65.42 cd
<i>H. trifurcata</i> -larva	<i>Enterobacter sp</i>	29.17 c	59.17 d
	Testigo	0 d	0 e

*Medias con la misma letra en cada columna no son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$).

2.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se comprobó que algunas cepas bacterianas aisladas del intestino de tres depredadores de *Dactylopius* spp. metabolizaron el ácido carmínico, sustancia que se considera como parte de un mecanismo antidepredación en ese género de insectos (Eisner *et al.* 1980, 1994; Barreto-García *et al.* 2020). Algunos trabajos previos habían demostrado la capacidad de géneros bacterianos para metabolizar colorantes, y que su eficiencia variaba entre especies (Guadie *et al.* 2017; Hai-Hong *et al.* 2019), pero ninguno había tratado de relacionar simbiosis en depredadores de insectos que pudieran favorecer el metabolismo de colorantes de su presa, lo que se realizó como un aporte relevante en este trabajo.

Las seis cepas bacterianas aisladas de los tres depredadores de *Dactylopius* fueron eficientes en la metabolización del ácido carmínico (del 59 al 100%). Es probable que esa capacidad de metabolizar esa sustancia esté relacionada con la biología del depredador de donde se aisló. En el caso de las bacterias aisladas de la larva de *Laetilia coccidivora* (Lepidoptera), *E. gallinarum* y *B. cereus*, fueron las especies que presentaron el mayor porcentaje de decoloración. Esto podría relacionarse con su hábito depredador generalista y la selección biológica que ha tenido para alimentarse de colorantes u otras sustancias en sus presas. *L. coccidivora* tiene la capacidad

de alimentarse de *D. coccus*, que tiene la mayor concentración de ácido carmínico (19-25%), y de *D. opuntiae* (2-5%), además de otros pseudocóccidos (Barreto-García *et al.* 2020).

Staphylococcus sciuri y *Enterobacter* sp. se aislaron de la larva del coccinélido depredador especialista *H. trifurcata*, y *S. capitatus* del adulto. Nuevamente, la biología del depredador podría ayudar a relacionar un poco la capacidad de metabolización del ácido carmínico y su biología. La larva de *H. trifurcata* consume sobre todo a *D. opuntiae* y otras especies de *Dactylopius* con baja concentración de ácido carmínico (2-5%) (Vanegas-Rico *et al.* 2016). Además, en este depredador la capacidad de consumo de la presa sucede en su estado adulto comparado con los estados inmaduros. En otras palabras, el adulto es el que consume más del 70% de todo el alimento que necesita para poder completar su tiempo de desarrollo; por tanto, durante el proceso natural de selección el adulto está más expuesto a la necesidad de metabolizar el ácido carmínico de la presa. Adicionalmente, el adulto prefiere alimentarse de *D. opuntiae* que de *D. coccus* lo que se atribuye a la diferencia en concentración del ácido carmínico y probablemente a su capacidad para metabolizarlo (Vanegas-Rico *et al.* 2016; Trejo-Reyes *et al.* 2021).

Bacillus pumilus se aisló de larvas de *Le. bellula* (por ser díptero el adulto no se alimenta de *Dactylopius*), y se considera un depredador poco voraz que basa su alimentación en huevos y ninfas de *D. opuntiae* (Vanegas-Rico *et al.* 2010; Salas-Monzon *et al.* 2020). En esos estados de desarrollo es cuando hay menor concentración de ácido carmínico en su presa (Vanegas-Rico *et al.* 2016; Barreto-García *et al.* 2020; Salas-Monzón *et al.* 2020).

Cinco especies de bacterias que se evaluaron en este trabajo son anaerobias facultativas, y sólo *B. pumilus* es aeróbica facultativa, esto aparentemente favoreció su adaptación a las condiciones que se propusieron en este trabajo, 30 °C, pH de 7.0 y 120 rpm, y por consiguiente la expresión de enzimas que favorecieron la decoloración de la sustancia de interés, tal como lo mencionó Chen (2002) para colorantes metabolizados por bacterias. En conclusión, se presentó evidencia para indicar que los tres depredadores más comunes de *Dactylopius* sp. (*L. coccidivora*, *Le. bellula* e *H. trifurcata*), albergan simbiosis que contribuyen a metabolizar el ácido carmínico de sus presas, una sustancia que se considera tóxica para otros depredadores. En este trabajo sólo se evaluaron seis cepas bacterianas como simbiosis de dichos depredadores, es muy probable que la técnica de medio de cultivo sólido (Luria Bertani y R2A) haya limitado el número de especies

"cultivables" que se lograron aislar, y por supuesto no permitió conocer los simbioses obligados (que no se pueden cultivar) que pueden representar un porcentaje mayor de la microbiota.

DISCUSIÓN GENERAL

Los insectos escama del género *Dactylopius* producen ácido carmínico que se ha asociado a su sistema inmune (De La Cruz Hernandez-Hernandez *et al.* 2003) y sobre todo como un mecanismo antidepredación (Eisner *et al.* 1980, 1994; Barreto-García *et al.* 2020). Aun con la presencia de ácido carmínico en este género, hay insectos depredadores que se han especializado en este grupo de presas y otros que no pueden desarrollarse en ellas (Vanegas-Rico *et al.* 2010; Pacheco-Rueda *et al.* 2011; Barreto-García *et al.* 2020). Debido a la gran cantidad de trabajos que han demostrado la importancia de la flora microbiana en insectos herbívoros, xilófagos u hematófagos para aprovechar sus recursos alimentarios (Eleftherianos *et al.* 2013; Hongjie *et al.* 2017; Ankrah *et al.* 2018), se propuso probar la hipótesis que los depredadores de *Dactylopius* spp. albergan simbiontes microbianos en su intestino, y éstos tienen capacidad para metabolizar el ácido carmínico de su presa.

Para probar la hipótesis de este trabajo se incluyó a las tres especies de depredadores más comunes de *Dactylopius* spp. El lepidóptero generalista *Laetilia coccidivora* que tiene la capacidad de alimentarse de especies de *Dactylopius* con concentraciones contrastantes de ácido carmínico (3-5% versus 19-25%), y dos depredadores especialistas, la larva del díptero *Leucopina bellula*, y la larva y el adulto del coccinélido *Hyperaspis trifurcata*, estos especialistas tienen preferencia por alimentarse sobre *D. opuntiae*, especie silvestre que tiene una concentración de ácido carmínico del 3-5% (Barreto-García *et al.* 2020; Trejo-Reyes *et al.* 2021).

En el capítulo dos de este trabajo se aislaron bacterias del intestino de los tres depredadores en los medios de cultivo Luria Bertani y R2A, y se identificaron por la amplificación y secuenciación parcial del gen 16S ARN. Las bacterias aisladas de cada especie depredadora fueron diferentes. La mayor abundancia de las bacterias cultivables del intestino de los depredadores fueron con morfología de cocos y Gram positivas, aunque la literatura indica que las cepas cultivables representan sólo una pequeña parte del microbioma (1 al 10%) asociado a un huésped (Lagkouvardos *et al.* 2017; Callegari *et al.* 2020). Adicionalmente, hay muchos factores (pH, etapa de la vida, entorno del hospedante, etc.) que pueden influir en la estructura de la comunidad bacteriana (Yan *et al.* 2021). Aun con todas esas variantes y riesgos, se decidió continuar

trabajando con las bacterias cultivables por la gran experiencia en ese grupo, y sus posibilidades de mantenerlas en laboratorio.

Se encontró especificidad bacteriana en el tracto digestivo entre los depredadores: en *L. coccidivora* se identificó a *Bacillus cereus*, *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus*. Estos géneros ya se habían reportado en lepidópteros con funciones importantes en el metabolismo de algunos compuestos (Paniagua-Voirol *et al.* 2018). En el adulto de *H. trifurcata* se aisló a *Lactococcus* sp., *Lactococcus lactis* y *Staphylococcus capitis*, seguido por *H. trifurcata*-larva con una especie de *Enterobacter* sp. y *Staphylococcus sciuri*; finalmente, *Le. bellula* con una sola especie, *Bacillus pumilus*. Estos géneros de bacterias han sido reportados en tractos intestinales de otros insectos (Lehman *et al.* 2009), pero nunca se habían relacionado con su participación en metabolización del ácido carmínico. En el caso de *Enterobacter* se les ha encontrado la capacidad de metabolizar compuestos complejos (Paniagua-Voirol *et al.* 2018). En algunos estudios se ha encontrado que la diversidad bacteriana en el intestino de los depredadores está relacionada con los hábitos alimenticios por ejemplo: la familia Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae, Staphylococcaceae son abundantes en depredadores (Kudo *et al.* 2019), y varios de los géneros bacterianos que encontramos pertenecen a estas familias en la cual cumplen funciones importantes en el metabolismo de compuestos específicos (Kudo *et al.* 2019).

En el capítulo tres se evaluó la capacidad de dichas bacterias para metabolizar el ácido carmínico. Para evaluar esto se hicieron ensayos en cajas Petri con medio sólido Luria Bertani (Blánquez *et al.* 2019), se sembraron las cepas con diferentes concentraciones de ácido carmínico (200 a 1000 ppm), y todas las bacterias crecieron sin problema. Además, se encontró evidencia de cambios de color en el medio sólido. No obstante, no fue posible determinar el grado de metabolización del ácido carmínico a través de la decoloración en el medio sólido. Por ello se eligió realizar la evaluación en un medio líquido (caldo), éste permitió evaluar la metabolización del colorante por las bacterias a través de la decoloración en un espectrofotómetro, pero fue necesario que el caldo tuviera una fuente adicional de carbono y nitrógeno, el medio mínimo MSM9 y medio modificado Zhou y Zimmerman solos (Aruna *et al.* 2015; Hai-Hong *et al.* 2019) no fueron útiles para observar decoloración; aparentemente el carbono (glucosa) y el nitrógeno (extracto de levadura) fueron útiles porque esas fuentes orgánicas complejas favorecen una

biodegradación eficiente en varias especies bacterianas y sustratos (Aruna *et al.* 2015; Prasad 2015).

Seis cepas bacterianas aisladas de los tres depredadores (*Enterococcus gallinarum* y *Bacillus cereus* de *L. coccidivora*; *Staphylococcus capitis* del adulto de *H. trifurcata*, y *Staphylococcus sciuri* y *Enterobacter* sp. de la larva de *H. trifurcata*; *Bacillus pumilus* de *Le. bellula*) metabolizaron el ácido carmínico en medio líquido (caldo) a las 72 y 168 h, todas ellas presentaron porcentajes de decoloración del 59 al 100%. Hasta donde conocemos, esta es la primera ocasión que se prueba una hipótesis para este modelo de depredador-presa con una sustancia compleja como el ácido carmínico, se demostró la existencia de simbioses en los depredadores que contribuyen a la metabolización de un compuesto complejo y tóxico de la presa, lo que aparentemente les ha permitido explotar un recurso que muchas otras especies no pueden.

Es muy probable que la metodología (medio sólido en caja Petri) haya limitado el número de especies bacterianas que se pudieron aislar y cultivar de los depredadores de *Dactylopius* spp. Además, las cepas no cultivables pueden representar un porcentaje mucho mayor de especies del microbioma asociado a un huésped (Lagkouvardos *et al.* 2017; Callegari *et al.* 2020), y probablemente haya muchos otros simbioses que tienen un papel relevante en la metabolización del ácido carmínico en cada especie de depredador. A todo esto pueden incluirse muchas otras variantes para la metabolización del ácido carmínico; por ejemplo, que si se hacen evaluaciones a diferente pH, con diferentes sustancias y concentraciones (más glucosa, más nitrógeno, etc.), con mezclas de especies de simbioses, etc. En realidad, los hallazgos de este trabajo representan una ventana de oportunidades para entender la relación de los depredadores con presas que tienen compuestos tóxicos en insectos, y se necesita mucho trabajo para demostrar la importancia de los simbioses en la relación depredador presa en insectos. Un trabajo adicional es evidenciar que enzimas son eficientes para metabolizar el colorante, y los genes que están involucrados en este metabolismo. Si bien el primer objetivo puede ser entender la relación de estos complejos en la interacción presa-depredador, en un futuro algunos complejos bacterianos podrían ser utilizadas en procesos de bioremediación con sustancias complejas; por ejemplo, muchos colorantes que son un problema en el ambiente y representan retos complejos para su atención.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, se presentó evidencia para indicar que los tres depredadores más comunes de *Dactylopius* spp., *L. coccidivora*, *Le. bellula* e *H. trifurcata*, albergan simbioses en sus intestinos que contribuyen a metabolizar el ácido carmínico de sus presas, una sustancia que se considera tóxica para otros depredadores. Es muy probable que la técnica de medio de cultivo en este trabajo (medio sólido) haya limitado el número de especies "cultivables" que se lograron recuperar, y no permitió conocer los simbioses obligados que pueden representar un porcentaje importante de la microbiota.

LITERATURA CITADA

INTRODUCCIÓN

- Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Prabhu, D. I. G., Vasan, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., & Vendan, S. E. (2010). Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, *10*(107), 1–20. <https://doi.org/10.1673/031.010.10701>
- Augustinos, A. A., Kyritsis, G. A., Papadopoulos, N. T., Abd-Alla, A. M. M., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2015). Exploitation of the medfly gut microbiota for the enhancement of sterile insect technique: Use of *Enterobacter* sp. in larval diet-based probiotic applications. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136459>
- Barreto-García, O. A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Vanegas-Rico, J. M., Viguera, A. L., & Portillo, L. (2020). *Laetilia coccidivora* feeding on two cochineal insect species, Does the prey affect the fitness of the predator? *BioControl*, *65*(6), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10047-6>
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., & Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(4), 1567–1577. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7186-9>
- Callegari, M., Jucker, C., Fusi, M., Leonardi, M. G., Daffonchio, D., Borin, S., Savoldelli, S., & Crotti, E. (2020). Hydrolytic Profile of the Culturable Gut Bacterial Community Associated With *Hermetia illucens*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01965>
- Cortazar Martínez, A., González Ramírez, C. A., Coronel Olivares, C., Escalante Lozada, J. A., Castro Rosas, J., & Villagómez Ibarra, J. R. (2012). INDUSTRIA TEXTIL Biotechnology applied to the degradation of textile industry dyes. *Universidad y Ciencia*, *28*(2), 187–199.
- De Almeida, L. G., De Moraes, L. A. B., Trigo, J. R., Omoto, C., & Cônsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>
- De La Cruz Hernandez-Hernandez, F., García-Gil De Muñoz, F., Rojas-Martínez, A., Hernández-Martínez, S., & Lanz-Mendoza, H. (2003). Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *54*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/arch.10099>
- Deng, D., Guo, J., Zeng, G., & Sun, G. (2008). Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *62*(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.017>
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, *23*(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>

- Eisner, T., Nowicki, S., Goetz, M., & Meinwald, J. (1980). Red cochineal dye (carminic acid): Its role in nature. *Science*, 208(4447), 1039–1042. <https://doi.org/10.1126/science.208.4447.1039>
- Eisner, T., Ziegler, R., McCormick, J. L., Eisner, M., Hoebeker, E. R., & Meinwald, J. (1994). Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia*, 50(6), 610–615. <https://doi.org/10.1007/BF01921733>
- Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., & Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology*, 4 MAR(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Flores-Alatorre, H. L., Abrego-Reyes, V., Reyes-Esparza, J. A., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014). Variation in the Concentration of Carminic Acid Produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at Various Maturation Stages. *Journal of Economic Entomology*, 107(4), 1700–1705. <https://doi.org/10.1603/EC13475>
- Flórez, L. V., Biedermann, P. H. W., Engl, T., & Kaltenpoth, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*, 32(7), 904–936. <https://doi.org/10.1039/c5np00010f>
- Gorrens, E., Van Moll, L., Frooninckx, L., De Smet, J., & Van Campenhout, L. (2021). Isolation and Identification of Dominant Bacteria From Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) Envisaging Practical Applications. *Frontiers in Microbiology*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665546>
- Hai-Hong L., Wang, Y. Tao, Wang, Y., Wang, H. Xia, Sun, K. Kai, & Lu, Z. Mei. (2019). Bacterial degradation of anthraquinone dyes. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 20(6), 528–540. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900165>
- Hongjie L, Yelle, D. J., Li, C., Yang, M., Ke, J., Zhang, R., Liu, Y., Zhu, N., Liang, S., Mo, X., Ralph, J., Currie, C. R., & Mo, J. (2017). Lignocellulose pretreatment in a fungus-cultivating termite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 4709–4714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618360114>
- Jang, S., & Kikuchi, Y. (2020). Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Current Opinion in Insect Science*, 41, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.06.004>
- Kannangara, R., Siukstaite, L., Borch-Jensen, J., Madsen, B., Kongstad, K. T., Staerk, D., Bennedsen, M., Okkels, F. T., Rasmussen, S. A., Larsen, T. O., Frandsen, R. J. N., & Møller, B. L. (2017). Characterization of a membrane-bound C-glucosyltransferase responsible for carminic acid biosynthesis in *Dactylopius coccus* Costa. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02031-z>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel,

- M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). and Their Gut Microbes. *Wild*, 1647(November), 1647–1652. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- Petitpierre, E. (1995). Presence of anthraquinones in the haemolymph of *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae , Chrysomelinae). October.
- Prasad, D. V. R. (2015). Biodecolorization of Anthraquinone Textile (Acid Blue 25) Dye by *Klebsiella* sp. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(3), 3216–3222.
- Ramírez-Puebla, S. T., Rosenblueth, M., Chávez-Moreno, C. K., Catanho Pereira De Lyra, M. C., Tecante, A., & Martínez-Romero, E. (2010). Molecular phylogeny of the genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and identification of the symbiotic bacteria. *Environmental Entomology*, 39(4), 1178–1183. <https://doi.org/10.1603/EN10037>
- Rasmussen, S. A., Kongstad, K. T., Khorsand-Jamal, P., Kannangara, R. M., Nafisi, M., Van Dam, A., Bennedsen, M., Madsen, B., Okkels, F., Gotfredsen, C. H., Staerk, D., Thrane, U., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., & Frandsen, R. J. N. (2018). On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 96, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.002>
- Rizzi, A., Crotti, E., Borruso, L., Jucker, C., Lupi, D., Colombo, M., & Daffonchio, D. (2013). Characterization of the Bacterial Community Associated with Larvae and Adults of *Anoplophora chinensis* Collected in Italy by Culture and Culture-Independent Methods. *BioMed Research International*, 2013, 420287. <https://doi.org/10.1155/2013/420287>
- Trejo-Reyes, C. A., Rodríguez-Leyva, E., & Méndez-Gallegos, J. (2021). ¿Influye la concentración de ácido carmínico en la preferencia alimentaria de *Hyperaspis trifurcata* (Coleoptera: Coccinellidae) entre dos especies de presas? *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 20(1), e2021204. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2021.20.4>
- Vanegas-Rico, J. M., Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., & Valdez, J. (2010). Natural enemies of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) on *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller in Central Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(2), 415–433.
- Velayutham, K., Madhava, A. K., Pushparaj, M., Thanarasu, A., Devaraj, T., Periyasamy, K., & Subramanian, S. (2018). Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R using isolated bacterial culture (*Staphylococcus* sp. K2204). *Environmental Technology (United Kingdom)*, 39(22), 2900–2907. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1369579>
- Vera-Ponce, A., Ormeño-Orrillo, E., Ramírez-Puebla, S. T., Rosenblueth, M., Esposti, M. D., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (2017). Candidatus *Dactylopiibacterium carminicum*, a nitrogen-fixing symbiont of *Dactylopius* cochineal insects (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Genome Biology and Evolution*, 9(9), 2237–2250. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx156>
- Wernegreen, J. J. (2012). Strategies of genomic integration within insect-bacterial mutualisms. *Biological Bulletin*, 223(1), 112–122. <https://doi.org/10.1086/BBLv223n1p112>
- Xu, X., Shao, M., Yin, C., Mao, Z., Shi, J., Yu, X., Wang, Y., Sun, F., & Zhang, Y. (2020).

Diversity, Bacterial Symbionts, and Antimicrobial Potential of Termite-Associated Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00300>

Yan, J., Zhang, B., Li, G., & Xu, X. (2021). Bacterial communities in predatory mites are associated with species and diet types. *BioControl*, 66(6), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10112-8>

Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., Yoon, C., Nam, Y. Do, Kim, Y. J., Choi, J. H., Kim, J. Y., Shin, N. R., Kim, S. H., Lee, W. J., & Bae, J. W. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>

CHAPTER I

1. Lee AH, Husseneder C, and Hooper-Bùi L (2008) Culture-independent identification of gut bacteria in fourth-instar red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98(1): p. 20-33.

2. Rizzi A, Crotti E, Borruso L, Jucker C, Lupi D, Colombo M, and Daffonchio D (2013) Characterization of the Bacterial Community Associated with Larvae and Adults of *Anoplophora chinensis* Collected in Italy by Culture and Culture-Independent Methods. *BioMed research international*. 2013: p. 420287.

3. Mandla R, Ento S, and Kalia V (2018) Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. 5.

4. Xu X, Shao M, Yin C, Mao Z, Shi J, Yu X, Wang Y, Sun F, and Zhang Y (2020) Diversity, Bacterial Symbionts, and Antimicrobial Potential of Termite-Associated Fungi. *Frontiers in Microbiology*. 11(300).

5. Berasategui A, Shukla S, Salem H, and Kaltenpoth M (2016) Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(4): p. 1567-1577.

6. Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, and Kaltenpoth M (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*. 32(7): p. 904-936.

7. Paniagua Voirol LR, Frago E, Kaltenpoth M, Hilker M, and Fatouros NE (2018) Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host. *Frontiers in Microbiology*. 9(556).

8. Almeida LGd, Moraes LABd, Trigo JR, Omoto C, and Cônsoli FL (2017) The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLOS ONE*. 12(3): p. e0174754.

9. Lundgren JG, Lehman RM, and Chee-Sanford J (2007) Bacterial Communities within Digestive Tracts of Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 100(2): p. 275-282, 8.

10. Li H, Yelle DJ, Li C, Yang M, Ke J, Zhang R, Liu Y, Zhu N, Liang S, Mo X, Ralph J, Currie CR, and Mo J (2017) Lignocellulose pretreatment in a fungus-cultivating termite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(18): p. 4709.
11. Park JM, You Y-H, Back C, Kim H, Ghim S-Y, and Park J (2017) Fungal load in *Bradysia agrestis*, a phytopathogen-transmitting insect vector. *Symbiosis*. 74: p. 145-158.
12. Flores-Alatorre HL, Abrego-Reyes V, Reyes-Esparza JA, Angeles E, and Alba-Hurtado F (2014) Variation in the Concentration of Carminic Acid Produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at Various Maturation Stages. *Journal of Economic Entomology*. 107(4): p. 1700-1705.
13. Barreto-García OA, Rodríguez-Leyva E, Lomeli-Flores JR, Vanegas-Rico JM, Vigueras AL, and Portillo L (2020) *Laetilia coccidivora* feeding on two cochineal insect species, Does the prey affect the fitness of the predator? *BioControl*. 65(6): p. 727-736.
14. De la Cruz Hernández-Hernández F, de Muñoz FG-G, Rojas-Martínez A, Hernández-Martínez S, and Lanz-Mendoza H (2003) Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54(1): p. 37-45.
15. Eisner T, Nowicki S, Goetz M, and Meinwald J (1980) Red Cochineal Dye (Carminic Acid): Its Role in Nature. *Science*. 208: p. 1039 - 1042.
16. Eisner T, Ziegler R, McCormick JL, Eisner M, Hoebeke ER, and Meinwald J (1994) Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia*. 50(6): p. 610-615.
17. Vanegas-Rico JM, Lomelí-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, Mora-Aguilera G, and Valdez JM (2010) Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta zoológica mexicana*. 26: p. 415-433.
18. Vanegas-Rico JM, Rodríguez-Leyva E, Lomelí-Flores JR, González-Hernández H, Pérez-Panduro A, and Mora-Aguilera G (2016) Biology and life history of *Hyperaspis trifurcata* feeding on *Dactylopius opuntiae*. *BioControl*. 61(6): p. 691-701.
19. Gebreziher HG, Hailu Z, and Abrha E (2018) Effect of botanical extracts from indigenous plant, Kotsili Mariam, on mortality of carmine cochineal insect (*Dactylopius coccus* Costa). *Journal of entomology and zoology studies*. 6: p. 1107-1116.
20. Aldama Aguilera C, Llanderal Cázares C, Soto Hernández M, and Castillo Márquez LE (2005) Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* costa) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia*. 39(2): p. 161-171.
21. Salas-Monzón R, Rodríguez-Leyva E, Lomelí-Flores JR, and Vanegas-Rico JM How Two Predators Feed on *Dactylopius opuntiae* Beneath its Ventral Side in *Southwestern Entomologist*. 2020. p. 823-826, 4.
22. Li H-h, Wang Y-t, Wang Y, Wang H-x, Sun K-k, and Lu Z-m (2019) Bacterial degradation of anthraquinone dyes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 20(6): p. 528-540.

23. Deng D, Guo J, Zeng G, and Sun G (2008) Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 62: p. 263-269.
24. Prasad D.V. R (2015) Biodecolorization of Anthraquinone textile (Acid Blue 25) dye by *Klebsiella* sp. *Periodical*. 6 3216-3222.
25. Velayutham K, Madhava AK, Pushparaj M, Thanarasu A, Devaraj T, Periyasamy K, and Subramanian S (2018) Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R using isolated bacterial culture (*Staphylococcus* sp. K2204). *Periodical*. 39 2900-2907 DOI: 10.1080/09593330.2017.1369579.
26. You S-J and Teng J-Y (2009) Anaerobic decolorization bacteria for the treatment of azo dye in a sequential anaerobic and aerobic membrane bioreactor. *Periodical*. 40 500-504 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2009.01.007>.
27. Olsen RA and Bakken LR (1987) Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology*. 13(1): p. 59-74.
28. Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, and Sa TM (2008) Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Bacteria Isolated from Larval Guts of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology*. 56(4): p. 327-333.
29. Hernández-Flores L, Llanderal-Cázares C, Guzmán-Franco AW, and Aranda-Ocampo S (2015) Bacteria Present in *Comadia redtenbacheri* Larvae (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology*. 52(5): p. 1150-1158.
30. Seeley HW, VanDemark PJ, and Lee JJ *Microbes in action: a laboratory manual of microbiology*. 2001, New York: W.H. Freeman.
31. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, and Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): p. 697.
32. Galkiewicz JP and Kellogg CA (2008) Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and environmental microbiology*. 74(24): p. 7828-7831.
33. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: p. 95-98.
34. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): p. 2731-2739.
35. Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 39(4): p. 783-791.
36. Tagliavia M, Messina E, Manachini B, Cappello S, and Quatrini P (2014) The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC Microbiology*. 14(1): p. 136.

37. Engel P and Moran NA (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(5): p. 699-735.
38. Sivakumar G, Rangeshwaran R, Yandigeri M, Mohan M, Venkatesan T, Ballal C, Ramanujam B, Yalashetti S, Kumari S, and Verghese A (2017) Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 87: p. 534-543.
39. Zhao M, Sun P-F, Du L-N, Wang G, Jia X-M, and Zhao Y-H (2014) Biodegradation of methyl red by *Bacillus* sp. strain UN2: decolorization capacity, metabolites characterization, and enzyme analysis. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(9): p. 6136-6145.
40. Chengalroyen MD and Dabbs ER (2013) The microbial degradation of azo dyes: minireview. *Periodical*. 29 389-399 DOI: 10.1007/s11274-012-1198-8.
41. Ahmad A, Ghosh A, Schal C, and Zurek L (2011) Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiology*. 11(1): p. 23.
42. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, and Fukatsu T (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Periodical*. 109 8618 DOI: 10.1073/pnas.1200231109.
43. Pandiarajan J and Krishnan M (2018) Comparative bacterial survey in the gut of lepidopteran insects with different bionetwork. *Microbiology*. 87(1): p. 103-115.
44. Deschamps AM, Mahoudeau G, and Lebeault JM (1980) Fast degradation of kraft lignin by bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 9(1): p.
45. Frece J, Cvrtila J, Topić I, Delaš F, and Markov K (2014). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as Potential Functional Starter Culture in Food technology and biotechnology. University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology. p. 489-494.

CAPÍTULO II

- Aruna, B., Silviya, L. R., Kumar, E. S., & Rani, P. R. (2015). Decolorization of Acid Blue 25 dye by individual and mixed bacterial consortium isolated from textile effluents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 4(January 2019), 1015–1024.
- Augustinos, A. A., Kyritsis, G. A., Papadopoulos, N. T., Abd-Alla, A. M. M., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2015). Exploitation of the medfly gut microbiota for the enhancement of sterile insect technique: Use of *Enterobacter* sp. in larval diet-based probiotic applications. *PLoS ONE*, 10(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136459>
- Barreto-García, O. A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Vanegas-Rico, J. M., Vigueras, A. L., & Portillo, L. (2020). *Laetilia coccidivora* feeding on two cochineal insect species, Does the prey affect the fitness of the predator? *BioControl*, 65(6), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10047-6>
- Callegari, M., Jucker, C., Fusi, M., Leonardi, M. G., Daffonchio, D., Borin, S., Savoldelli, S., &

- Crotti, E. (2020). Hydrolytic Profile of the Culturable Gut Bacterial Community Associated With *Hermetia illucens*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01965>
- Chen, B. Y. (2002). Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: Toxicity and kinetics. *Process Biochemistry*, *38*(3), 437–446. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00151-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00151-6)
- Dapson, R. W. (2005). A method for determining identity and relative purity of carmine, carminic acid and aminocarminic acid. *Biotechnic and Histochemistry*, *80*(5–6), 201–205. <https://doi.org/10.1080/10520290500485781>
- De Almeida, L. G., De Moraes, L. A. B., Trigo, J. R., Omoto, C., & Cònsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>
- De La Cruz Hernandez-Hernandez, F., García-Gil De Muñoz, F., Rojas-Martínez, A., Hernández-Martínez, S., & Lanz-Mendoza, H. (2003). Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *54*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/arch.10099>
- Deng, D., Guo, J., Zeng, G., & Sun, G. (2008). Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *62*(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.017>
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, *23*(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Eisner, T., Nowicki, S., Goetz, M., & Meinwald, J. (1980). Red cochineal dye (carminic acid): Its role in nature. *Science*, *208*(4447), 1039–1042. <https://doi.org/10.1126/science.208.4447.1039>
- Eisner, T., Ziegler, R., McCormick, J. L., Eisner, M., Hoebeker, E. R., & Meinwald, J. (1994). Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia*, *50*(6), 610–615. <https://doi.org/10.1007/BF01921733>
- Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., & Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology*, *4* MAR(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Gilbert, S. F. (2020). Developmental symbiosis facilitates the multiple origins of herbivory. *Evolution and Development*, *22*(1–2), 154–164. <https://doi.org/10.1111/ede.12291>
- Guadie, A., Tizazu, S., Melese, M., Guo, W., Ngo, H. H., & Xia, S. (2017). Biodecolorization of

- textile azo dye using *Bacillus* sp. strain CH12 isolated from alkaline lake. *Biotechnology Reports*, 15(July), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.06.007>
- Hai-Hong L., Wang, Y. tao, Wang, Y., Wang, H. xia, Sun, K. kai, & Lu, Z. mei. (2019). Bacterial degradation of anthraquinone dyes. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 20(6), 528–540. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900165>
- Hongoh, Y. (2010). Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(6), 1145–1151. <https://doi.org/10.1271/bbb.100094>
- Karim, E., Dhar, K., & Hossain, T. (2018). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology Decolorization of Textile Reactive Dyes by Bacterial Monoculture and Consortium Screened from Textile Dyeing Effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.005>
- Pacheco-Rueda, I., Lomelí-Flores, J. R., Rodríguez- Leyva, E., & Ramírez- Delgado, M. (2011). Ciclo de vida y parámetros poblacionales de *Symphorobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) criado con *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(2), 325–340. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.272756>
- Paniagua Voirol LR, Frago E, Kaltenpoth M, Hilker M, & Fatouros N E. (2018). Bacterial symbionts in lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00556>
- Park, J. M., You, Y. H., Back, C. G., Kim, H. H., Ghim, S. Y., & Park, J. H. (2018). Fungal load in *Bradysia agrestis*, a phytopathogen-transmitting insect vector. *Symbiosis*, 74(2), 145–158. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0494-3>
- Polin, S., Le Gallic, J. F., Simon, J. C., Tsuchida, T., & Outreman, Y. (2015). Conditional reduction of predation risk associated with a facultative symbiont in an insect. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143728>
- Prasad, D. V. R. (2015). Biodecolorization of Anthraquinone Textile (Acid Blue 25) Dye by *Klebsiella* sp. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(3), 3216–3222.
- Rasmussen, S. A., Kongstad, K. T., Khorsand-Jamal, P., Kannangara, R. M., Nafisi, M., Van Dam, A., Bennedsen, M., Madsen, B., Okkels, F., Gotfredsen, C. H., Staerk, D., Thrane, U., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., & Frandsen, R. J. N. (2018). On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 96, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.002>
- Rozadilla, G., Cabrera, N. A., Virla, E. G., Greco, N. M., & McCarthy, C. B. (2020). Gut microbiota of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae as revealed by metatranscriptomic analysis. *Journal of Applied Entomology*, 144(5), 351–363. <https://doi.org/10.1111/jen.12742>
- Salas-Monzon R, Rodríguez Leyva E, Lomelí-Flores J. R, Vanegas Rico J. M. (2020). How two depredators feed on *Dactylopius opuntiae* beneath its ventral side. *Southwestern Entomologist* .45(3), 823–826.
- Salazar T.F.V, & Castellanos C.R. (2018). Biodecoloración de tintes sintéticos industriales por

bacterias termófilas con actividad tipo lacasa. *Revista Ciencia y Tecnología Para El Desarrollo UJCM.*, 4(7), 9–21.

- Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, M. S., Mohan, M., Venkatesan, T., Ballal, C. R., Ramanujam, B., Yalashetti, S., Kumari, S., & Verghese, A. (2017). Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 87(4), 534–539.
- Stapelfeldt, H., Jun, H., & Skibsted, L. H. (1993). Fluorescence properties of carminic acid in relation to aggregation, complex formation and oxygen activation in aqueous food models. *Food Chemistry*, 48(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90213-Y](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90213-Y)
- Trejo-Reyes, C. A., Rodríguez-Leyva, E., & Méndez-Gallegos, J. (2021). ¿Influye la concentración de ácido carmínico en la preferencia alimentaria de *Hyperaspis trifurcata* (Coleoptera: Coccinellidae) entre dos especies de presas? *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 20(1), e2021204. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2021.20.4>
- Vanegas-Rico, J.M, Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., & Valdez, J. (2010). Natural enemies of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) on *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller in Central Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(2), 415–433.
- Vanegas-Rico, J. M., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., González-Hernández, H., Pérez-Panduro, A., and Mora-Aguilera, G. 2016. Biology and life history of *Hyperaspis trifurcata* feeding on *Dactylopius opuntiae*. *BioControl*, 61(6), 691–701. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9753-0>
- Velayutham, K., Madhava, A. K., Pushparaj, M., Thanarasu, A., Devaraj, T., Periyasamy, K., & Subramanian, S. (2018). Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R using isolated bacterial culture (*Staphylococcus* sp. K2204). *Environmental Technology (United Kingdom)*, 39(22), 2900–2907. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1369579>
- Xu, X., Shao, M., Yin, C., Mao, Z., Shi, J., Yu, X., Wang, Y., Sun, F., & Zhang, Y. (2020). Diversity, Bacterial Symbionts, and Antimicrobial Potential of Termite-Associated Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00300>

DISCUSIÓN GENERAL

- Ankrah, N. Y. D., Chouaia, B., & Douglas, A. E. (2018). The cost of metabolic interactions in symbioses between insects and bacteria with reduced genomes. *MBio*, 9(5), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01433-18>
- Aruna, B., Silviya, L. R., Kumar, E. S., & Rani, P. R. (2015). Decolorization of Acid Blue 25 dye by individual and mixed bacterial consortium isolated from textile effluents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 4(January 2019), 1015–1024.
- Barreto-García, O. A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Vanegas-Rico, J. M., Viguera, A. L., & Portillo, L. (2020). *Laetilia coccidivora* feeding on two cochineal insect species,

- Does the prey affect the fitness of the predator? *BioControl*, 65(6), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10047-6>
- Blánquez, A., Rodríguez, J., Brissos, V., Mendes, S., Martins, L. O., Ball, A. S., Arias, M. E., & Hernández, M. (2019). Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.020>
- Callegari, M., Jucker, C., Fusi, M., Leonardi, M. G., Daffonchio, D., Borin, S., Savoldelli, S., & Crotti, E. (2020). Hydrolytic Profile of the Culturable Gut Bacterial Community Associated With *Hermetia illucens*. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01965>
- De La Cruz Hernandez-Hernandez, F., García-Gil De Muñoz, F., Rojas-Martínez, A., Hernández-Martínez, S., & Lanz-Mendoza, H. (2003). Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/arch.10099>
- Eisner, T., Nowicki, S., Goetz, M., & Meinwald, J. (1980). Red cochineal dye (carminic acid): Its role in nature. *Science*, 208(4447), 1039–1042. <https://doi.org/10.1126/science.208.4447.1039>
- Eisner, T., Ziegler, R., McCormick, J. L., Eisner, M., Hoebeker, E. R., & Meinwald, J. (1994). Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. *Experientia*, 50(6), 610–615. <https://doi.org/10.1007/BF01921733>
- Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., & Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology*, 4 MAR(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046>
- Hai-Hong L., Wang, Y. tao, Wang, Y., Wang, H. xia, Sun, K. kai, & Lu, Z. mei. (2019). Bacterial degradation of anthraquinone dyes. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 20(6), 528–540. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900165>
- Hongjie L, Yelle, D. J., Li, C., Yang, M., Ke, J., Zhang, R., Liu, Y., Zhu, N., Liang, S., Mo, X., Ralph, J., Currie, C. R., & Mo, J. (2017). Lignocellulose pretreatment in a fungus-cultivating termite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 4709–4714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618360114>
- Kudo, R., Masuya, H., Endoh, R., Kikuchi, T., & Ikeda, H. (2019). Gut bacterial and fungal communities in ground-dwelling beetles are associated with host food habit and habitat. *ISME Journal*, 13(3), 676–685. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0298-3>
- Lagkouvardos, I., Overmann, J., & Clavel, T. (2017). Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes*, 0976(April), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1320468>
- Lehman, R. M., Lundgren, J. G., & Petzke, L. M. (2009). Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. *Microbial Ecology*, 57(2), 349–358.

<https://doi.org/10.1007/s00248-008-9415-6>

- Pacheco-Rueda, I., Lomelí-Flores, J. R., Rodríguez- Leyva, E., & Ramírez- Delgado, M. (2011). Ciclo de vida y parámetros poblacionales de *Symphorobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) criado con *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(2), 325–340. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.272756>
- Paniagua-Voirol LR, Frago E, Kaltenpoth M, Hilker M, & Fatouros N E. (2018). Bacterial symbionts in lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00556>
- Prasad, D. V. R. (2015). Biodecolorization of Anthraquinone Textile (Acid Blue 25) Dye by *Klebsiella* sp. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(3), 3216–3222.
- Trejo-Reyes, C. A., Rodríguez-Leyva, E., & Méndez-Gallegos, J. (2021). ¿Influye la concentración de ácido carmínico en la preferencia alimentaria de *Hyperaspis trifurcata* (Coleoptera: Coccinellidae) entre dos especies de presas? *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 20(1), e2021204. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2021.20.4>
- Vanegas-Rico, J.M, Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., & Valdez, J. (2010). Natural enemies of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) on *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller in Central Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*, 26(2), 415–433.
- Yan, J., Zhang, B., Li, G., & Xu, X. (2021). Bacterial communities in predatory mites are associated with species and diet types. *BioControl*, 66(6), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10112-8>