



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**MICROORGANISMOS PRESENTES EN LARVAS DE**  
***Comadia redtenbacheri* HAMMERSCHMIDT**  
**(LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

**Biól. LORENA HERNÁNDEZ FLORES**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

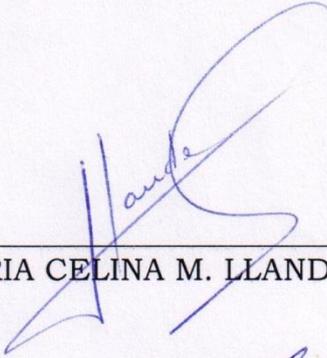
2015

La presente tesis titulada: **Microorganismos presentes en larvas de *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae)**, realizada por la alumna: **Lorena Hernández Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

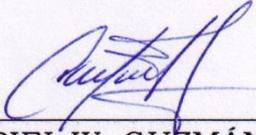
MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
DRA. MARIA CELINA M. LLANDERAL CÁZARES

ASESOR

  
DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR

  
DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero 2015

**MICROORGANISMOS PRESENTES EN LARVAS DE *Comadia redtenbacheri* HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**RESÚMEN GENERAL**

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar los microorganismos presentes en larvas de gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae), para mejorar técnicas de colecta y manejo de poblaciones silvestres, así como las del sistema de cría en condiciones de laboratorio. Se analizaron las bacterias de larvas sanas y enfermas tanto externas como del intestino de poblaciones, con y sin manejo durante la colecta y el acopio. El análisis filogenético del gen 16S rRNA reveló la existencia de los géneros y especies *Paenibacillus* sp., *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pseudomycooides*, *Corynebacterium variabile*, *Enterococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. y *Bacillus cereus*. La mayor abundancia de estos organismos se encontró en poblaciones de larvas con manejo y dentro de ellas, las consideradas como enfermas. En pupas del insecto se aislaron hongos pertenecientes a los géneros *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. y *Beauveria* sp., identificados con mayor abundancia en tratamientos que se mantuvieron con humedad.

**Palabras clave:** gusano rojo, contaminación, bacterias, hongos, manejo.

**MICROORGANISMS PRESENT IN *Comadia redtenbacheri*  
HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE) LARVAE**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**GENERAL ABSTRACT**

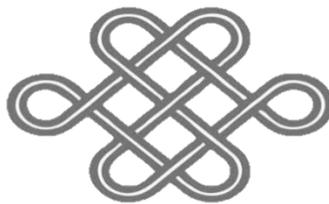
The objective of this study was to isolate and identify the microorganisms present in the larvae of the agave red worm *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae) to improve techniques for collection and management of wild populations as well as for the system of rearing in the laboratory. Bacteria from healthy and diseased larvae, both external and from intestines, with and without handling during collection and gathering, were analyzed. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed the existence of the following genera and species: *Paenibacillus* sp., *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pseudomycooides*, *Corynebacterium variabile*, *Enterococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. and *Bacillus cereus*. The greatest abundance of these organisms was found in populations that had been handled and, of these, in specimens considered diseased. In pupae, fungi belonging to the genera *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. and *Beauveria* sp., were found and were more abundant in treatments maintained with moisture.

**Key words:** red worm, contamination, bacteria, fungi, handling.

Tesis dedicada a mis padres *Laura y Fernando*, las personas más importantes de mi vida, gracias por su motivación constante, ayuda y apoyo incondicional.

A mis hermanos, por compartir conmigo la alegría de los éxitos logrados.

A mis amigos que estuvieron pendientes de esta etapa importante para mí, y con seguridad sé que a pesar de la distancia celebran conmigo la felicidad de este día, y a los que estuvieron a mi lado en todo momento, impulsándome para lograr el triunfo que hoy les brindo, gracias *Isaac, Vicky, Gabriel*.



## **AGRADECIMIENTOS**

A los millones de mexicanos, quienes, a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y el **Colegio de Postgraduados**, han financiado parte de mi formación académica.

A los integrantes de mi Consejo Particular;

**Dr. M. Celina M. Llanderal Cázares, Dr. Ariel W. Guzmán Franco, Dr. Sergio Aranda Ocampo, Dr. Héctor González Hernández**, por ser unos excelentes guías, por su apoyo, disposición, las facilidades y los consejos otorgados para consolidar este proyecto, principalmente por darme la oportunidad y confianza de desarrollarlo.

A mis compañeros de laboratorio, por proporcionarme una estancia más placentera dentro de éste.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESÚMEN GENERAL</b> .....	ii
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	4
<b>CAPITULO 1. BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LARVAS DE <i>Comadia redtenbacheri</i> HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)</b>	
RESÚMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	25
LITERATURA CITADA.....	31

**CAPITULO 2. HONGOS AISLADOS DE PUPAS DE *Comadia redtenbacheri* HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

RESÚMEN.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUCCIÓN.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
RESULTADOS.....	48
DISCUSIÓN.....	52
LITERATURA CITADA.....	57

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>CAPITULO 1</b>		
<b>1.1</b>	Muestra de larvas para la separación con base en su apariencia.....	<b>16</b>
<b>1.2</b>	Obtención de bacterias externas de <i>C. redtenbacheri</i> .....	<b>16</b>
<b>1.3</b>	(a)Aislamientos de bacterias superficiales e intestinales de larvas, (b) caracterización morfológica de colonias bacterianas aisladas.....	<b>17</b>
<b>1.4</b>	Morfología celular bacteriana de morfotipos.....	<b>17</b>
<b>1.5</b>	Árbol filogenético que muestra las bacterias aisladas de <i>C. redtenbacheri</i> , bacterias aisladas de <i>A. salmiana</i> , y su relación con géneros y especies basados en la secuenciación del gen 16S rRNA.....	<b>20</b>
<b>1.6</b>	Promedio de morfotipos bacterianos presentes en la superficie de larvas de <i>C. redtenbacheri</i> con manejo y sin manejo, incluyendo sanas y enfermas.....	<b>22</b>
<b>1.7</b>	Promedio de morfotipos bacterianos presentes en el intestino de larvas de <i>C. redtenbacheri</i> con manejo y sin manejo, incluyendo sanas y enfermas.....	<b>24</b>

**CAPITULO 2**

<b>2.1</b>	Separación en grupos de larvas muertas extraídas de capullos.....	<b>46</b>
<b>2.2</b>	Incubación de larvas en cámara húmeda.....	<b>46</b>
<b>2.3</b>	Aislamiento de hongos a partir de su crecimiento sobre larvas.....	<b>47</b>
<b>2.4</b>	Caracterización morfológica de hongos aislados.....	<b>47</b>
<b>2.5</b>	Observación microscópica para la identificación de hongos aislados de <i>C. redtenbacheri</i> .....	<b>48</b>
<b>2.6</b>	Número de larvas muertas de <i>C. redtenbacheri</i> , en tratamientos que fueron mantenidos en el laboratorio a temperatura variable.....	<b>51</b>
<b>2.7</b>	Número de larvas muertas de <i>C. redtenbacheri</i> , en tratamientos que fueron mantenidas en el laboratorio a temperatura constante.....	<b>52</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
<b>CAPITULO 1</b>		
<b>1.1</b>	Características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas.....	<b>19</b>
<b>1.2</b>	Identificación de bacterias aisladas de <i>C. redtenbacheri</i> basadas en la secuenciación del gen 16S rRNA, utilizando análisis BLAST y Máxima Parsimonia.....	<b>21</b>
<b>CAPITULO 2</b>		
<b>2.1</b>	Características de larvas muertas extraídas de puparios.....	<b>48</b>
<b>2.2</b>	Descripción de hongos aislados de larvas muertas de <i>Comadia redtenbacheri</i> .....	<b>49</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Alrededor del mundo se han reportado cerca de 1400 especies de insectos que el hombre utiliza como alimento (Johnson, 2010). Los insectos comestibles contienen una alta cantidad de proteínas, vitaminas y aminoácidos que pueden aportar al ser humano. En muchos países se realiza la entomofagia, pero en regiones como Asia, África y América Latina, es altamente influenciada por prácticas culturales y religiosas (FAO, 2014).

En México continuamente se incrementa la demanda de especies de insectos comestibles, tanto para su consumo nacional como internacional. La venta de insectos comestibles se realiza desde lugares lejanos y poco conocidos, llegando a diversos sitios de consumo, principalmente de tipo gourmet. Su venta no está regulada y por lo tanto tampoco sujeta a normas establecidas, lo que da lugar a la explotación irracional y colecta desmedida que afectan el mantenimiento del recurso o la conservación de éste (Ramos *et al.*, 2006).

Entre las especies de insectos que son comercializadas, se encuentra el gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae), que es apreciado por algunos consumidores como alimento y da valor agregado a las botellas de mezcal al ser incluido en ellas (Hernández-Livera *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de las larvas que se comercializan presentan signos o síntomas

de alguna enfermedad, así como parasitismo (Zetina *et al.*, 2009; Zetina y Llanderal, 2014).

Los pocos estudios que se han realizado con este insecto se refieren a su biología, comportamiento, parasitoides asociados, intentos de producción en condiciones controladas y su relación con el agave (Dampf, 1927; Nolasco *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2003; Hernández-Livera *et al.*, 2005; Llanderal-Cázares *et al.*, 2007, 2010; Zetina *et al.*, 2009, 2011, 2012; Miranda *et al.*, 2013).

En varias de estas investigaciones se han generado procedimientos para la cría del insecto en confinamiento, y se ha reportado la disminución de las poblaciones destinadas a obtener adultos por la mortalidad de larvas y pupas debido a contaminación (Miranda *et al.*, 2013). Es común que se presenten agentes bióticos contaminantes dentro de los sistemas de manejo y de cría, tales como virus, levaduras, bacterias y hongos, problema que es frecuente en las dietas artificiales que son las más susceptibles de ser colonizadas por la acción de estos microorganismos (Inglis y Cohen, 2004); además, el sometimiento a factores estresantes en las poblaciones de insectos como cambio de dieta y condiciones ambientales, favorecen que algunos microorganismos se multipliquen en los tejidos de los hospederos ya debilitados. Aunado a esto, si las condiciones favorecen a aquellas bacterias y hongos oportunistas, estos pueden actuar como patógenos (Sikorowski y Lawrence, 1994). Se ha sugerido que al disminuir la contaminación microbiana tanto en el manejo como en el sistema de

cría, se podría lograr una mayor producción con mejor calidad (Lastra y Gómez, 2000), lo cual puede resultar al llevar a cabo una estandarización de los procedimientos, una eficiente producción y una higiene adecuada (Singh, 1982).

Se han registrado diversos trabajos sobre entomofagia alrededor del mundo, que tratan el valor nutricional (Bukkens, 1997; Ramos y Viejo, 2007) y su consumo en diferentes países del mundo (Bequaert, 1921; NGuyen, 1928; Bergier, 1941; Bodenheimer, 1951; Reims, 1962; Van Der Meer, 1965; Meyer, 1973; Taylor, 1975; Posey, 1978; Mitsuhashi, 1980,1997; Nkuoka, 1987; Sahagún, 1988; Sutton, 1988; Arana, 1991; Cherry, 1991; Lenko y Papavero, 1996; Yhoung *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999, 2009; DeFoliart, 1999; Medeiros, 2002; Allotey y Mpuchane, 2003; Yen, 2009, 2010, 2012). Sin embargo, existe poco conocimiento sobre la composición y diversidad de las poblaciones microbianas que habitan en insectos comestibles en comparación con los registros que se tienen de insectos de importancia agrícola. Desde 1968, se reportó la presencia de la bacteria *Serratia marcescens* Bizio en huevos de *Heliothis zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), lo que constituyó el primer registro de su presencia en el orden Lepidoptera (Bell, 1968).

Dada la importancia económica del gusano rojo del maguey, visto como un recurso alimenticio y debido a que no se tienen registros previos sobre estudios relacionados, surge la necesidad de aislar e identificar a los microorganismos asociados a larvas de *C. redtenbacheri* y conocer

su fuente de origen, para determinar una forma de control efectiva en el sistema de cría “*in vitro*”, así como en su colecta y manejo.

### LITERATURA CITADA

- Allotey, J. y Mpuchane, S. 2003. Utilization of useful insects as food source. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 3: 1-6.
- Arana, F. 1991. Comer Insectos. Planeta, México.
- Bell, V. J. 1968. *Serratia marcescens* found in eggs of *Heliothis zea*: Tests against *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 13: 151-152.
- Bequaert, J. 1921. Insects as food. How they have augmented the food supply of mankind in early and recent years. *Natural History Journal* 21: 191-200.
- Bergier, E. 1941. Insectes Comestibles et Peuples Entomophages. Ed. Rullière, France.
- Bodenheimer, N. 1951. Insects as Human Food. Junk Publishers, The Hague, Holland.
- Bukkens, S. G. F. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition* 36: 287-319.
- Camacho, A. D., Sánchez, H. A., Nolasco, M. A. y Jiménez, L. J. E. 2003. Observaciones en condiciones de laboratorio de la Biología del “Gusano rojo de maguey” *Comadia redtenbacheri* H. (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 2: 281-287.
- Chen, X. y Feng, Y. 1999. The Edible Insects of China. China Science and Technology Press, Beijing.
- Chen, X., Feng, Y. y Chen, Z. 2009. Common edible insects and their utilization in China. *Entomological Research* 39: 299-303.
- Cherry, R. 1991. Use of insects by Australian aborigenes. *American Entomologist* 32: 304-310.
- Dampf, A. 1927. Contribución al conocimiento de la morfología de los primeros estados de *Hypopta agavis* Blázquez *chilodora* (Dyar) (Lepidoptera, Familia Cossidae), plaga de los magueyes en la Mesa Central de México. Oficina para la Defensa Agrícola. Imprenta de la Dirección de Estudios Geográficos y Climatológicos. México.
- DeFoliart, G. R. 1999. Insects as food: Why the western attitude is important. *Annual Review of Entomology* 44: 21-50.

- FAO. 2014. Insects for food and feed. (<http://www.fao.org/forestry/edibleinsects/en/>)
- Hernández-Livera, R. A., Llanderal-Cázares, C., Castillo-Márquez, L. E., Valdez-Carrasco, J. y Nieto-Hernández, R. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539-544.
- Hernández-Livera, R. A., Llanderal-Cázares, C., Castillo-Márquez, L. E., Valdez-Carrasco, J. y Nieto-Hernández, R. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539-544.
- Inglis, G. D. y Cohen, A. C. 2004. Influence of antimicrobial agents on the spoilage of meat-based entomophage diet. *Journal of Economic Entomology* 97: 235-250.
- Johnson, V. D. 2010. The contribution of edible forest insects to human nutrition and forest management, pp. 5-23. *En* P. B. Durst, D. V. Johnson, R. L. Leslie y K. Shono (eds.), *Forest insects as food: humans bite back, proceedings of workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development*. Bangkok, FAO Regional Office for Asia and the Pacific.
- Lastra, B. L. A. y Gómez, L. L. A. 2000. Cría y producción masiva de insectos en un programa de control biológico en caña de azúcar, pp. 335-340. *En* A. A. López (ed.), *1er Curso-Taller Internacional de Control Biológico. Componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible*. Corpoica, Bogotá.
- Lenko, K. y Papavero, N. 1996. *Insetos no Folclore*. Pléiade/Fudacao de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo.
- Llanderal-Cázares, C., De los Santos Posadas, H. M., Almanza-Valenzuela, I., Nieto-Hernández, R. y Castillejos-Cruz, C. 2010. Establecimiento del gusano rojo de maguey en invernadero. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 26: 25-31.
- Llanderal-Cázares, C., Nieto-Hernández, R., Almanza-Valenzuela, I. y Ortega-Álvarez, C. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6: 252-255.
- Medeiros, C. N. E. 2002. *Manual de Etnoentomología*. Ed. Sociedad Entomológica Aragonesa, España.
- Meyer, R. V. B. 1973. Edible insects in the three different ethnic groups of Papua and New Guinea. *American Journal of Clinical Nutrition* 26: 663-677.

- Miranda, P. K., Llanderal-Cázares, C., De los Santos Posadas, H. M., Portillo-Martínez, L. y Viguera-Guzmán, A. L. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist* 96: 1424-1433.
- Mitsubishi, J. 1980. *Edible Insects in the World*. Kokinshoin, Kanda, Tokyo, Japan.
- Mitsubishi, J. 1997. Insects as a traditional food in Japan. *Ecology of Food Nutrition* 36: 187-199.
- NGuyen, C. T. 1928. Notes sur les insectes comestibles au Tonkín. *Bulletin Economique d'Indochine* 31: 735-744.
- Nkuoka, E. 1987. Les insectes comestibles dans les sociétés d'Afrique Centrale. *Revue Scientifique et Culturelle du CICIBA* 6: 171-178.
- Nolasco, M. A., Jiménez, L. J. E. y Camacho, A. D. 2002. Inducción de la pupación y colonización del gusano rojo de maguey *Comadia redtenbacheri* H. (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 1: 125-130.
- Posey, D. A. 1978. Ethnoentomological survey of Amerind groups in lowland Latin America. *Florida Entomologist* 61: 225-229.
- Ramos, E. J. y Viejo, M. J. L. 2007. Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Sección Biología* 102: 61-87.
- Ramos, E. J., Pino, J. M. y Conconi, M. 2006. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica* 45: 291-318.
- Reims, H. 1962. *Die Insekten Nahrung der Australischen Ureinwohner*. Ed. Akademie-Verlag-Berlin.
- Sahagún, B. 1988. *Historia General de las cosas de la Nueva España*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes y Alianza Editorial Mexicana, México.
- Sikorowski, P. P. y Lawrence, A. M. 1994. Microbial contamination and insect rearing. *American Entomologist* 40: 240-253.
- Singh, P. 1982. The rearing of beneficial insects. *New Zealand Entomologist* 7: 304-310.
- Sutton, M. 1988. *Insects as Food: aboriginal entomophagy in the Great Basin*. Ballena Press Anthropology Papers, Menlo Park, California.
- Taylor, R. 1975. *Butterflies in My Stomach*. Ed. Woodbridge Press, Santa Barbara, California.

- Von Der Meer, J. C. 1965. Insects eaten by the Karo-Batak people. *Entomologische Berichten* 25: 101-107.
- Yen, A. L. 2009. Entomophagy and insect conservation: some thoughts for digestion. *Journal of Insect Conservation* 13: 667-670.
- Yen, A. L. 2010. Edible insects and other invertebrates in Australia: future prospects, pp. 65-84. En P. B. Durst, D. V. Johnson, R. L. Leslie y K. Shono (eds.), *Forest insects as food: humans bite back, proceedings of workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development*. Bangkok, FAO Regional Office for Asia and the Pacific.
- Yen, A. L. 2012. Edible insects and management of country. *Ecological Management and Restoration* 13: 97-99.
- Yhoun, A. J., Puwastein, P. y Attig, G. A. 1997. Edible Insects in Thailand: An unconventional protein source? *Ecology of Food and Nutrition* 36: 133-149.
- Zetina, D. A. H., Llanderal-Cázares, C. y De los Santos-Posadas, H. M. 2011. Logistic regression analysis to predict parasitism in larvae of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomotropica* 26: 1-6.
- Zetina, D. A. H., Llanderal-Cázares, C., Ruíz Cancino, E. y Khalaim, A. I. 2009. Registro para México de *Lissonota fascipennis* Townes (Hymenoptera: Ichneumonidae) como parasitoide del gusano rojo del maguey. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 25: 655-665.
- Zetina, D. A., Llanderal-Cázares, C. y Huerta, H. 2012. *Acantholespesia texana*: A New Report for Mexico, as a parasitoid of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt. *Southwestern Entomologist* 37: 235-237.
- Zetina, D. H. y Llanderal, C. 2014. Signs and symptoms in *Comadia redtenbacheri* Hamm. (Lepidoptera: Cossidae) larvae affected by parasitoids. *Southwestern Entomologist* 39: 285-290. <http://dx.doi.org/10.3958/059.039.0206>

**CAPITULO 1. BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LARVAS DE *Comadia redtenbacheri* HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**RESÚMEN**

Se estudió la comunidad bacteriana presente, externa e internamente, en el gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). La caracterización morfológica de los aislamientos determinó la existencia de 18 morfotipos y el análisis filogenético del gen 16S rRNA reveló la existencia de los géneros y especies *Paenibacillus* sp., *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pseudomycoides*, *Corynebacterium variabile*, *Enterococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. y *Bacillus cereus*. Se encontró mayor diversidad de bacterias en poblaciones de larvas con manejo, y dentro de estas, mayor abundancia en larvas consideradas como enfermas. Lo anterior indica que la flora bacteriana puede variar de acuerdo al manejo de las poblaciones de la larva durante la extracción, colecta y transporte.

**Palabras clave:** gusano rojo, agave, comunidad bacteriana, método de colecta, apariencia.

## **CHAPTER 1. BACTERIA PRESENT IN *Comadia redtenbacheri***

### **HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE) LARVAE**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

#### **ABSTRACT**

The external and internal bacterial community present in larvae of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae), an edible insect, was studied. Morphological characterization of the isolates determined the existence of 18 morphotypes and phylogenetic analysis of the rRNA 16S gene revealed the existence of the genera and species *Paenibacillus* sp., *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pseudomycoides*, *Corynebacterium variabile*, *Enterococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. and *Bacillus cereus*. Greater diversity of bacteria was found in populations of handled larvae and, of these, a larger abundance of larvae considered diseased. This indicates that bacterial flora can vary in accordance with how the larval populations are handled during extraction, collection and transport.

**Key words:** entomophagy, agave, bacterial community, collection procedure, appearance.

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de especies de insectos con importancia económica, son criadas en el laboratorio a partir de dietas artificiales (McKinley, 2004). Mejorar las técnicas desarrolladas en los sistemas de cría, beneficiara la producción de insectos con mayor calidad y en grandes números, lo que permitirá la selección de organismos para su comercialización (King y Powell, 1992), o como en el caso de *C. redtenbacheri*, para consumo.

Sin embargo, las condiciones ambientales en las que son mantenidos estos sistemas de cría, favorecen que bacterias no patógenas, en otras circunstancias, causen enfermedad en insectos confinados, provocando un alto porcentaje de mortalidad en larvas y adultos (Baumhower, 1977) a causa de daños en su desarrollo, aptitud biológica y potencial reproductivo (McLoughlin y Sikorowski, 1978; Sikorowski y Thompson, 1984).

Por otra parte, la flora microbiana de insectos silvestres, es diferente a la de insectos que son criados bajo condiciones de laboratorio, ya que en los primeros, la flora contenida es el resultado de una asociación relacionada con su ecosistema y que lo antecede mucho tiempo, en comparación con los organismos que se mantienen en un sistema de cría, ya que estos además contienen la flora microbiana humana y del ambiente del laboratorio (Sikorowski y Lawrence, 1994).

La microbiota intestinal representa todos los aspectos de las relaciones microbianas, desde patógenos hasta mutualistas obligados (Dillon y

Dillon, 2004). Son pocos los estudios referentes al rol funcional de la microbiota intestinal en insectos (Campbell, 1990) con las investigaciones más detalladas sobre la diversidad de microorganismos presentes (Brooks, 1963; Buchner, 1965; Dasch *et al.*, 1984; Lysenko, 1985; Tanada y Kaya, 1993) y entre las especies más estudiadas están las termitas (Brune, 1998; Bignell, 2000; Breznak, 2000, 2002; König, 2006), además de otros insectos de importancia agrícola (Kuzina *et al.*, 2001; Dillon y Charnley, 2002; Jeyaprakash *et al.*, 2003; Peloquin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Behar *et al.*, 2008; Dillon *et al.*, 2008; Killer *et al.*, 2010; Yoshiyama y Kimura, 2009; Gokce *et al.*, 2010; Danismazoglu *et al.*, 2012; Gayatri *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014), y de interés médico (Terenius *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Hamidou *et al.*, 2013; Minard *et al.*, 2013).

La secuenciación de ácidos nucleicos, particularmente del gen 16S rRNA, es una herramienta que permite la definición de la comunidad microbiana en insectos (Paster *et al.*, 1996; Brauman *et al.*, 2001; De Vries *et al.*, 2001; Hogg y Lehane, 2001; Toth *et al.*, 2001; Jeyaprakash *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2008; Terenius *et al.*, 2008; Gokce *et al.*, 2010).

Debido a la carencia de estudios enfocados a insectos comestibles, surge la necesidad de conocer la microbiota bacteriana asociada de manera natural a larvas de *C. redtenbacheri*, lo cual es un prerrequisito importante para la determinación de microorganismos patógenos, por lo que en esta investigación se planteó aislar e identificar las bacterias

presentes de manera natural en larvas de *C. redtenbacheri* y su variación en poblaciones de larvas colectadas tanto *in situ* como en sitios de venta.

## **1.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología de Insectos del postgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

### **Colecta de larvas**

Durante los meses de septiembre y octubre del 2013, se obtuvieron larvas de *C. redtenbacheri*, que se catalogaron en dos grupos de acuerdo a su procedimiento de colecta: 1) procedentes de distintas localidades del Estado de Hidalgo (Tulancingo, Tizayuca, Tlahuelilpan y Pozos) que fueron adquiridas con vendedores (con manejo) y 2) larvas extraídas en laboratorio directamente de plantas de *Agave salmiana* Otto ex Salm colectadas en los municipios de Hueypoxtla, Estado de México y Pozos, Estado de Hidalgo (sin manejo). Dentro de cada grupo se separaron las larvas sanas y aquellas con signos de posibles enfermedades y de cada individuo se obtuvieron las bacterias de la superficie del cuerpo y del intestino (Fig. 1.1).

### **Obtención de bacterias superficiales y del intestino**

#### *Bacterias de la superficie*

Se analizó una muestra de 125 larvas, de las cuales 80 fueron con manejo y 45 sin manejo. Cada individuo por separado fue anestesiado mediante su introducción durante unos segundos a una cámara con

cloroformo, se le ataron las aberturas anal y oral con hilos de algodón estéril, se sumergió en un tubo de ensayo con 10 ml de solución salina por tres minutos, se sacudió levemente y se le colocó sobre papel filtro estéril; el tubo con la solución salina se selló y etiquetó como baño salino para ser utilizado posteriormente. Una vez seca la larva, se transfirió a un tubo con 10 ml de solución germicida de Hipoclorito de Sodio (cloro comercial 5.25%) por cinco minutos, agitando ocasionalmente y posteriormente se transfirió a tubos con 10 ml de agua destilada estéril (tres cambios de agua por cada larva) (Fig. 1.2).

#### *Bacterias del intestino de las larvas*

Las larvas previamente esterilizadas en la sección anterior, se disectaron con una hoja de bisturí estéril mediante un corte del tegumento a lo largo de la línea media dorsal, a fin de exponer el tracto digestivo para cortarlo en tres partes, anterior (IA), media (IM) y posterior (IP), cada una de las cuales se introdujo en tubos Eppendorf para su maceración.

#### **Aislamiento de bacterias**

El aislamiento de bacterias se realizó a partir de los diferentes macerados y de la muestra etiquetada como baño salino, tomando una alícuota (100 µl) y estriando sobre placas de Agar Nutritivo BD Bioxon®, selladas con Parafilm® e incubadas a 25 °C por 24 a 48 horas (Lab-Line Instruments, Inc.® Melrose Park, Illinois, USA) [Fig. 1.3 (a)].

Las colonias bacterianas aisladas se preservaron en ultracongelación a -80 °C. La preservación se realizó en tubos criogénicos de 1.5 ml con 500

μl de caldo nutritivo en el que se suspendió la colonia bacteriana pura, añadiendo a éste 500 μl de glicerol al 40%. Adicionalmente y con fines de comparación usando la misma metodología descrita anteriormente, se aislaron bacterias de pencas en descomposición de *A. salmiana*, que habían estado colonizadas por larvas de *C. redtenbacheri*.

### **Caracterización morfológica de las colonias bacterianas**

Las colonias bacterianas resultantes fueron descritas con base en la morfología de la colonia, tomando en cuenta su forma, elevación, superficie, margen y densidad, de acuerdo con los criterios descritos por Seeley *et al.* (1991), de manera que todas las bacterias encontradas fueron asignadas a un morfotipo específico [Fig. 1.3 (b)].

El número de morfotipos bacterianos encontrados en el exterior e interior de las larvas fue comparado por separado, usando modelos lineales mixtos con el efecto de manejo (con y sin), apariencia (sana y enferma) y su interacción mediante la estimación de los componentes de varianza, usando el método de máxima verosimilitud restringida con el programa GenStat v.8.0 (Payne *et al.*, 2005).

### **Morfología celular bacteriana**

#### *Preparación de frotis para observar la morfología de células*

De cada colonia bacteriana aislada, se realizó un frotis de masa bacteriana en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos. La preparación se fijó al calor sobre la flama del mechero. La morfología se observó a 100X en inmersión en un microscopio óptico (Carl Zeiss® Göttingen, Germany).

### *Determinación Gram de las cepas bacterianas*

La determinación de la reacción Gram de las cepas bacterianas aisladas, se determinó mediante el protocolo descrito por Ryu (1940). A partir de un cultivo puro, se realizó un frotis sobre un portaobjetos de cada cepa de un cultivo puro de 24-48 h en una solución de KOH al 3% durante 10 segundos. Las células bacterianas que presentaron lisis durante este periodo y que formaron un hilo viscoso en el frotis, fueron catalogadas como Gram negativas; por el contrario, aquellas sin lisis ni hilo viscoso fueron consideradas Gram positivas.

### **Colocación filogenética de morfotipos bacterianos**

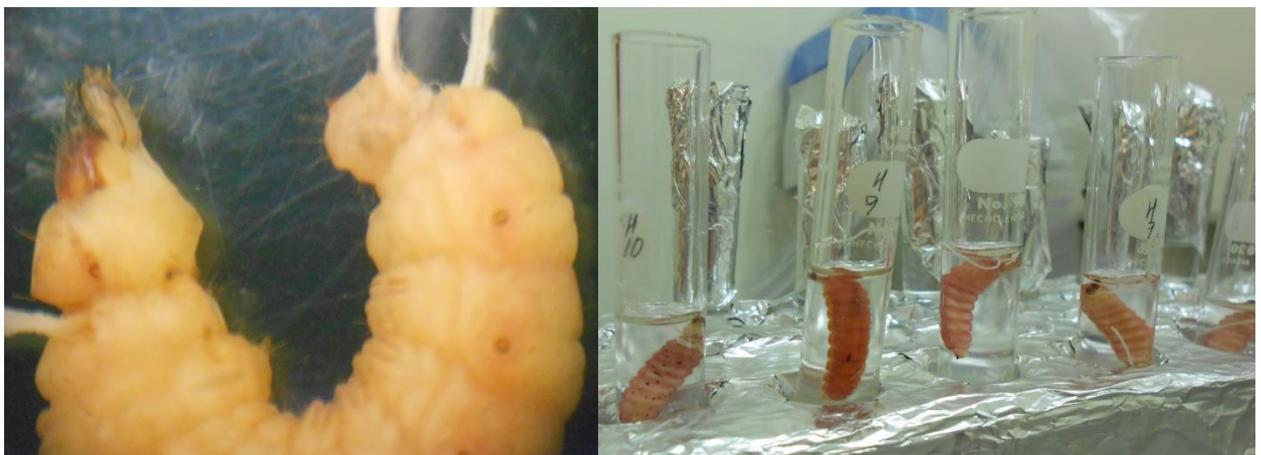
Diferentes placas de agar nutritivo de 50 mm de diámetro conteniendo una colonia de cada morfotipo bacteriano obtenido, fueron enviados a la empresa MACROGEN® en Corea para la secuenciación del gen 16S rRNA. Las secuencias resultantes se editaron mediante el software Bioedit versión 7.1.6.0. Para definir con mayor precisión las especies correspondientes a cada morfotipo bacteriano, las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rRNA fueron comparadas con secuencias del mismo gen encontradas en la base de datos Nucleotide Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014) mediante Máxima Parsimonia, con el programa Mega v.6. (Tamura *et al.*, 2011).

Adicionalmente, una muestra de 200 gr de larvas procedentes del municipio de Pozos, Hidalgo, se envió al Laboratorio de Inocuidad Biológica del Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA S.A. de

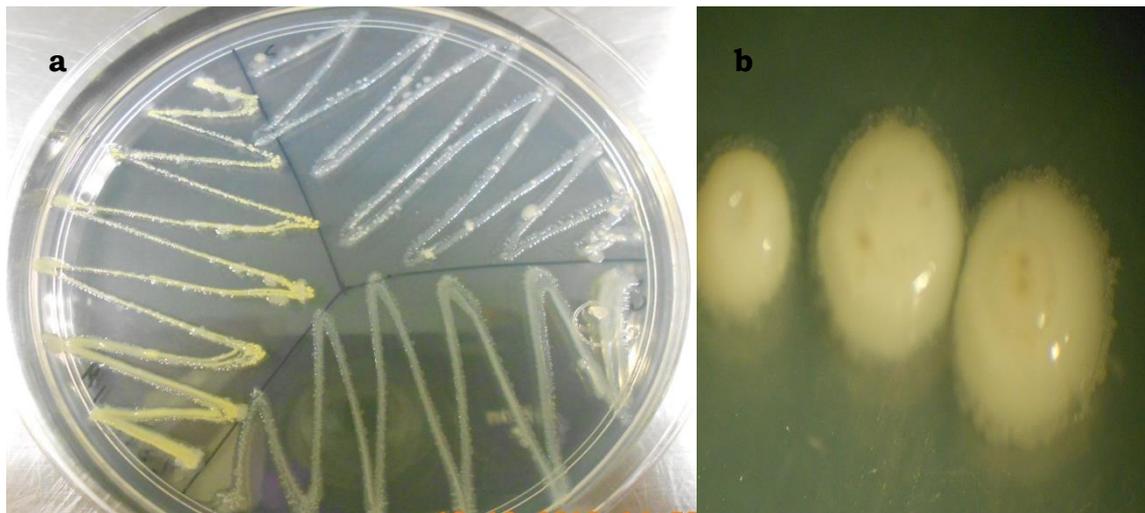
C.V., GISENA® en Texcoco, Estado de México, para la determinación de bacterias aerobias en placa, mohos y levaduras, bacterias coliformes en NMP, coliformes totales en placa y *Salmonella* spp.



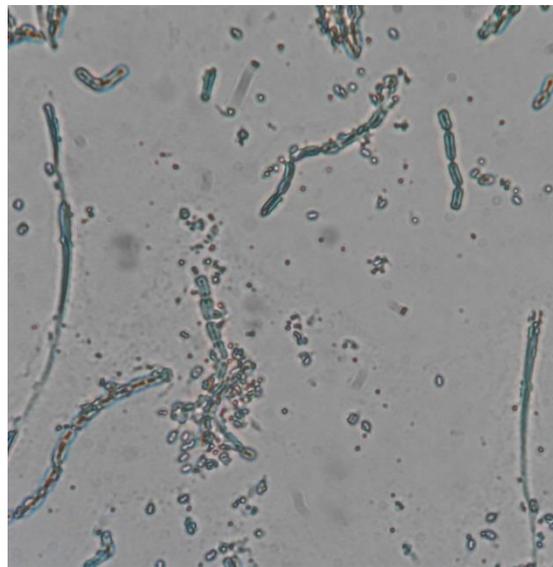
**Figura 1.1.** Muestra de larvas para la separación con base en su apariencia.



**Figura 1.2.** Obtención de bacterias externas de *C. redtenbacheri*.



**Figura 1.3.** (a) Aislamientos de bacterias superficiales e intestinales de larvas, (b) caracterización morfológica de colonias bacterianas aisladas.



**Figura 1.4.** Morfología celular bacteriana de morfotipos.

### **1.3 RESULTADOS**

Se analizó la comunidad bacteriana presente en 125 larvas de *C. redtenbacheri*, de las cuales 80 fueron con manejo y 45 sin manejo. A partir de ellas se obtuvieron 500 aislamientos pertenecientes al Intestino Anterior (IA), Intestino Medio (IM) e Intestino Posterior (IP), así como de la parte externa de cada organismo, además de 15 aislamientos obtenidos de la planta.

#### **Caracterización morfológica de las colonias**

Todos los aislamientos fueron descritos y agrupados en 18 morfotipos basados en la similitud del color de la colonia y su morfología (Cuadro 1.1).

#### **Morfología celular bacteriana**

La morfología de células bacterianas de 14 morfotipos (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M10, M11, M12, M13, M15, M16 y M18) presentó forma bacilar y en cuatro morfotipos (M8, M9, M14 y M17) se observó forma de cocos. En los 18 morfotipos seleccionados fue mayor la prevalencia de bacterias Gram positivas.

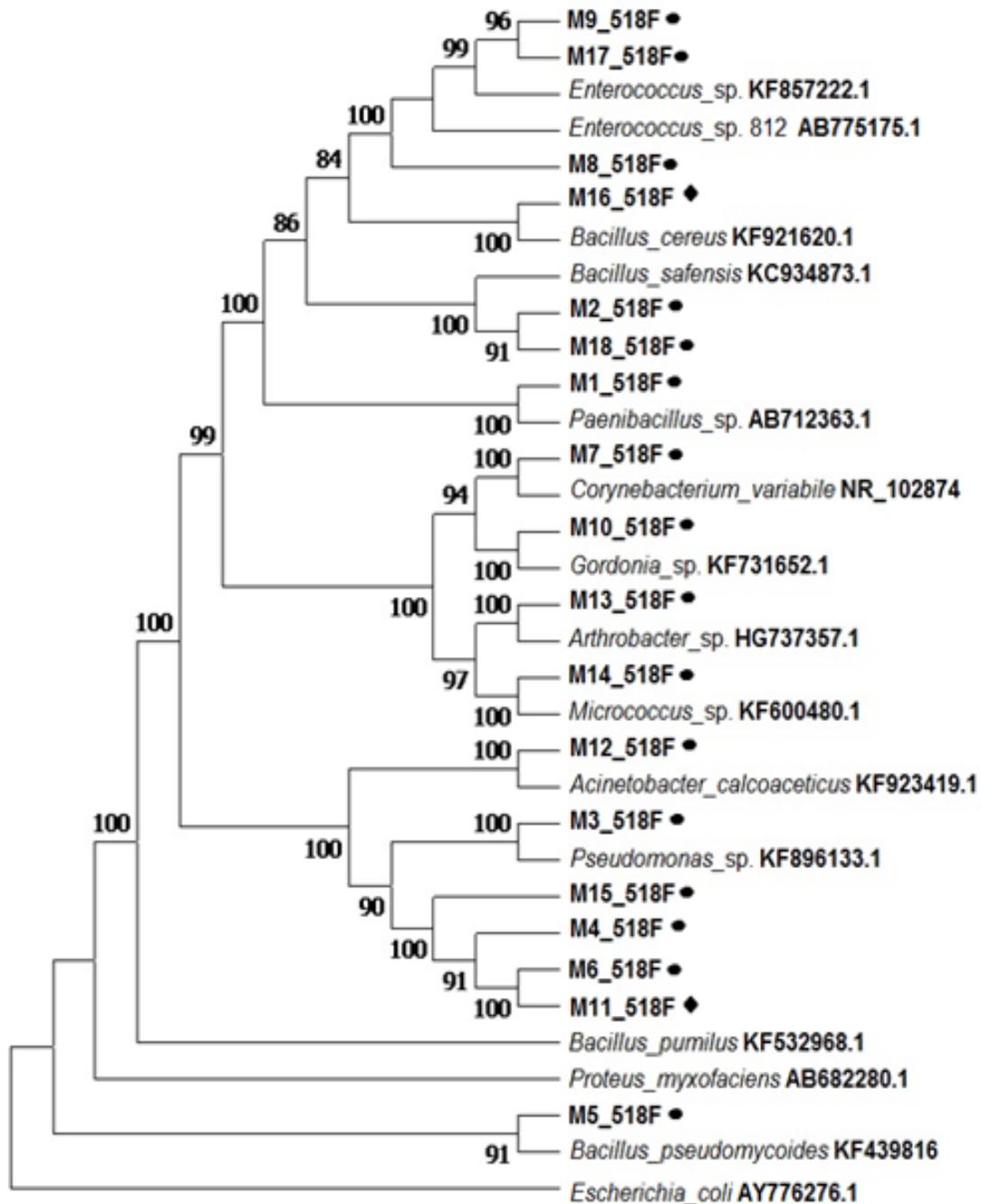
**Cuadro 1.1.** Características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas.

<b>Aislamiento</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Margen</b>	<b>Color</b>	<b>Gram</b>
M1	Circular	Pulvinada	Contorneada	Irregular	Opaca	+
M2	Irregular	Aplanada	Lisa	Ondulado	Traslúcida	+
M3	Circular	Convexa	Lisa	Entero	Traslúcida <sup>a</sup>	-
M4	Circular	Convexa	Lisa	Lobado	Opaca	-
M5	Puntiforme	Convexa	Lisa	Entero	Traslúcida	-
M6	Irregular	Convexa	Lisa	Lobado	Opaca <sup>a</sup>	-
M7	Circular	Elevada	Lisa	Entero	Opaca	+
M8	Circular	Aplanada	Lisa	Entero	Traslúcida	+
M9	Puntiforme	Aplanada	Lisa	Entero	Opaca	+
M10	Irregular	Umbonada	Rugosa	Irregular	Opaca <sup>b</sup>	+
M11	Circular	Aplanada	Lisa	Lobado	Traslúcida	-
M12	Circular	Pulvinada	Lisa	Lobado	Traslúcida	-
M13	Circular	Elevada	Lisa	Entero	Traslúcida	+
M14	Circular	Convexa	Lisa	Entero	Opaca <sup>a</sup>	+
M15	Filamentosa	Aplanada	Lisa	Filamentoso	Traslúcida	-
M16	Filamentosa	Aplanada	Rugosa	Filamentoso	Traslúcida	+
M17	Puntiforme	Aplanada	Lisa	Entero	Traslúcida	+
M18	Circular	Umbonada	Anillos concéntricos	Irregular	Opaca	+

<sup>a</sup> coloración amarilla, <sup>b</sup> coloración rosa

## Colocación filogenética de los morfotipos

El análisis filogenético basado en Máxima Parsimonia, relacionó a los 18 morfotipos con seis géneros y cinco especies de bacterias (Fig. 1.5).



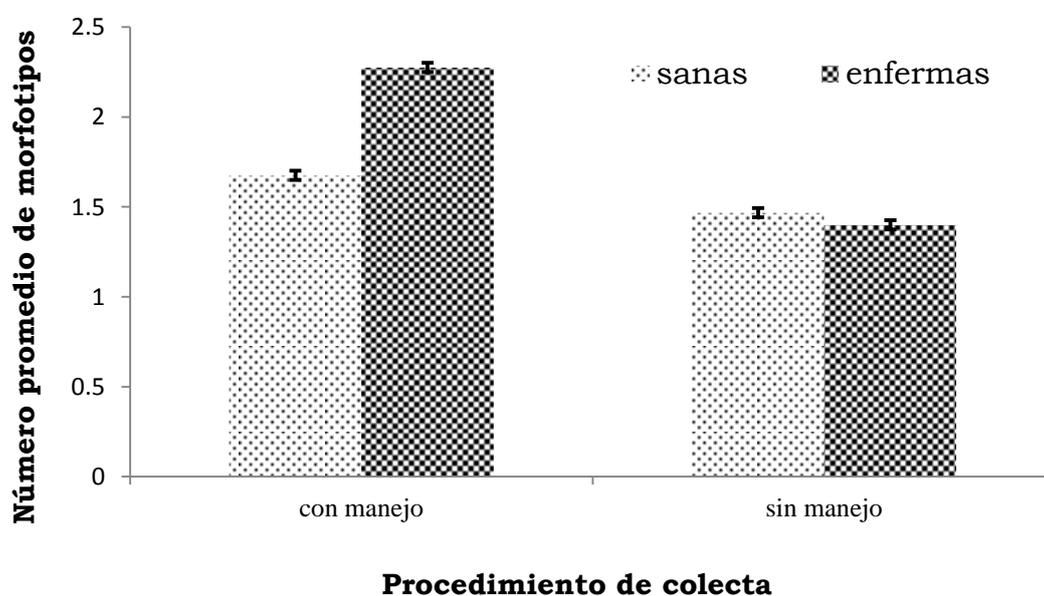
**Figura 1.5.** Árbol filogenético que muestra las bacterias aisladas de *C. redtenbacheri* (●), bacterias aisladas de *A. salmiana* (◆), y su relación con géneros y especies basados en la secuenciación del gen 16S rRNA.

**Cuadro 1.2.** Identificación de bacterias aisladas de *C. redtenbacheri* basadas en la secuenciación del gen 16S rRNA, utilizando análisis BLAST y Máxima Parsimonia.

<b>Aislamiento</b>	<b>Sugerencia GenBank</b>	<b>Número de acceso</b>
M1	<i>Paenibacillus</i> sp.	KM401416
M2	<i>Bacillus safensis</i>	KM401417
M3	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM401418
M4	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM401419
M5	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	KM401420
M6	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM401421
M7	<i>Corynebacterium variabile</i>	KM401422
M8	<i>Enterococcus</i> sp.	KM401423
M9	<i>Enterococcus</i> sp.	KM401424
M10	<i>Gordonia</i> sp.	KM401425
M11	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM401432
M12	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KM401426
M13	<i>Arthrobacter</i> sp.	KM401427
M14	<i>Micrococcus</i> sp.	KM401428
M15	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM401429
M16	<i>Bacillus cereus</i>	KM401433
M17	<i>Enterococcus</i> sp.	KM401430
M18	<i>Bacillus safensis</i>	KM401431

### Efecto del lugar de colecta y aspecto en la diversidad bacteriana

Se observó que el procedimiento de colecta de las larvas, es decir, el efecto con y sin manejo, influyó en la diversidad de morfotipos aislados externamente ( $F_{1, 121}=23.46$ ,  $P<0.001$ ) encontrando la mayoría de estos en las muestras con manejo. Del mismo modo, la apariencia de las larvas consideradas como enfermas, resultó con la mayor diversidad de morfotipos ( $F_{1, 121}=12.39$ ,  $P<0.001$ ). Además, se comprobó que aunque ligeramente ( $F_{1, 121}=8.57$ ,  $P=0.004$ ), la interacción de estos dos factores, es decir, el procedimiento de colecta aunado a su aspecto, sí contribuyen a la diversidad de bacterias aisladas, observando que en larvas enfermas con manejo se presentó un promedio mayor de morfotipos, lo que no sucedió en larvas enfermas con escasa manipulación (sin manejo) (Fig. 1.6).

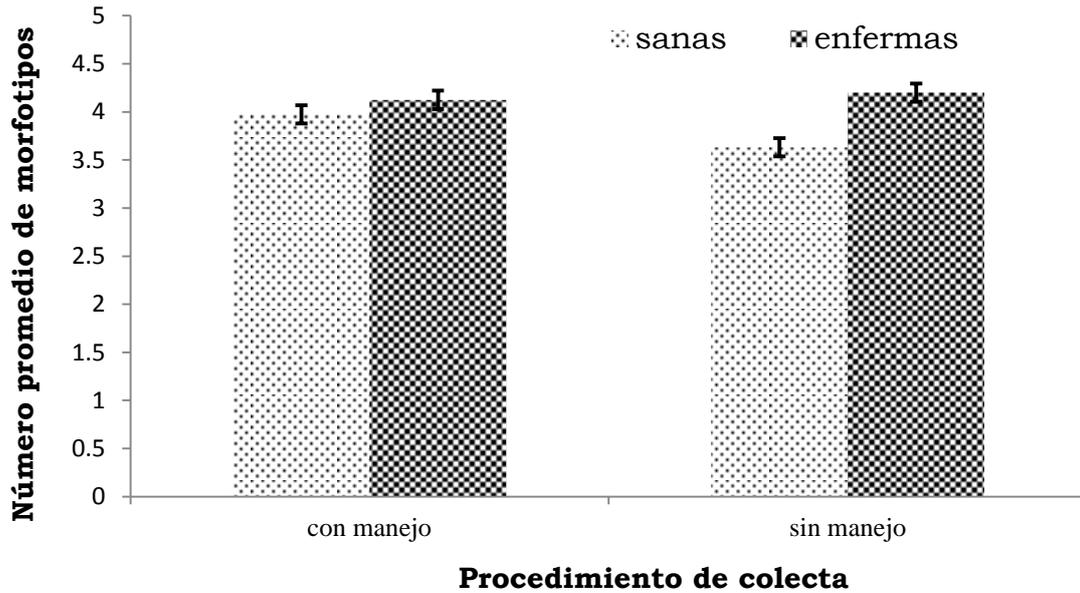


**Figura 1.6.** Promedio de morfotipos bacterianos presentes en la superficie de larvas de *C. redtenbacheri* con manejo y sin manejo, incluyendo sanas y enfermas. Las barras de error representan  $\pm 1 \times$  EEM (Error Estándar de la Media).

El análisis corrobora el registro del número de morfotipos encontrados en los individuos enfermos, ya que de 16 morfotipos identificados, ocho de ellos se aislaron externamente de larvas enfermas con manejo, donde *Arthrobacter* sp. presentó mayor abundancia (31%), seguido de *Pseudomonas* sp. (18%), *Corynebacterium variabile* y *Micrococcus* sp. con 15% cada una. Mientras que, en larvas sanas con manejo, se encontró que los géneros más abundantes fueron *Arthrobacter* sp. (39%), *Acinetobacter calcoaceticus* (25%), *Bacillus pseudomycooides* (19%) y *Enterococcus* sp. (9%).

En cambio, en aislamientos de la parte externa de larvas sin manejo, el género *Pseudomonas* sp. se identificó con mayor abundancia, representado con 54% para larvas sanas y 62% para larvas enfermas. *Arthrobacter* sp. (18%), *Enterococcus* sp. 812 (9%), *Gordonia* sp. (9%), *Acinetobacter calcoaceticus* (5%) y *Micrococcus* sp. (5%), se presentaron solo en larvas sanas, mientras que *Enterococcus* sp. (29%) y *Bacillus pseudomycooides* (9%) solo en larvas enfermas.

Para los aislamientos provenientes del intestino del insecto, se observó que el procedimiento de colecta ( $F_{1, 121}=1.18$ ,  $P=0.279$ ) y la apariencia enferma de las larvas, no favorecieron la diversidad de organismos bacterianos encontrados ( $F_{1, 121}=1.98$ ,  $P=0.162$ ). Tampoco se observó una interacción significativa entre estos dos factores ( $F_{1, 121}=0.92$ ,  $P=0.340$ ). Se observó una mayor diversidad de morfotipos en las larvas con manejo y con apariencia enferma, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 1.7).



**Figura 1.7.** Promedio de morfotipos bacterianos presentes en el intestino de larvas de *C. redtenbacheri* con manejo y sin manejo, incluyendo sanas y enfermas. Las barras de error representan  $\pm 1 \times$  EEM (Error Estándar de la Media).

En el intestino de larvas sanas sin manejo, se observó menor promedio de morfotipos donde el género *Enterococcus* sp. se registró con mayor abundancia (39%), seguido de *Pseudomonas* sp. (20%), *Acinetobacter pseudomycoides* (16%), *Bacillus pseudomycoides* (15%), *Arthrobacter* sp. (10%) y *Bacillus safensis* (4%). De igual manera, en larvas enfermas los géneros *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. fueron los más abundantes (41 y 37% respectivamente), además de *Bacillus pseudomycoides* (10%), *Acinetobacter calcoaceticus* (4%) y *Corynebacterium variabile* (4%).

Mientras que en larvas enfermas con manejo, también *Pseudomonas* sp. (29%) se observó cómo más abundante dentro de los aislamientos

obtenidos a partir del intestino, además de *Enterococcus* sp. (20%), los cuales también se reportaron con mayor abundancia en larvas sanas con 23%, seguido de *Bacillus pseudomycoloides* (13%), *Micrococcus* sp. y *Acinetobacter calcoaceticus* (10% cada una).

#### 1.4 DISCUSIÓN

Este estudio constituye la primera descripción de la comunidad bacteriana presente en la etapa larval de *C. redtenbacheri*, además de reportar bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, que fueron aisladas de pencas en descomposición que se encuentran cercanas al rizoma, donde de acuerdo con Granados (1993) las larvas llevan a cabo la mayor parte de su desarrollo. Ambos géneros son reportados como endófitos (Rosenblueth *et al.*, 2006) y no perjudican visiblemente a la planta (Hallman *et al.*, 1997; Schulz y Boyle, 2006), sino por el contrario se ha demostrado que las bacterias endófitas son capaces de promover crecimiento y salud a la planta (Compant *et al.*, 2005).

Todos los aislamientos fueron determinados con el fin de conocer la flora bacteriana asociada con *C. redtenbacheri*. Las poblaciones bacterianas pertenecientes a ocho géneros (*Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* y *Micrococcus*), han sido aislados de diferentes especies de insectos (Kuzina *et al.*, 2001; Osborn *et al.*, 2002; Adem y Demibag, 2007; Cox y Gilmore, 2007; Behar *et al.*, 2008; Dillon *et al.*, 2008; Ince *et al.*, 2008; Terenius *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Yoshiyama *et al.*,

2009; Gokce *et al.*, 2010; Marina *et al.*, 2011; Danismazoglu *et al.*, 2012; Gayatri *et al.*, 2012; Hamidou *et al.*, 2013; Hammer *et al.*, 2014).

Por otro lado, aunque su presencia fue mínima, también se encontraron organismos identificados como *Corynebacterium variabile* y *Gordonia* sp., bacterias que hasta el momento no se reportan en insectos, aunque algunas especies pertenecientes a este último género han sido estudiadas debido a su habilidad para degradar contaminantes tóxicos en el ambiente, sustancias como xenobióticos (Hernández *et al.*, 2001), hidrocarburos y componentes naturales que son difícilmente biodegradables (Xue *et al.*, 2003), por lo que son consideradas como benéficas para la agricultura en suelos salinos. Sin embargo, *Gordonia* sp. causa un amplio espectro de enfermedades en humanos, ya que se describen casos de infecciones vasculares, neurológicas, cutáneas y respiratorias, en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, además de bacteriemia, ventriculitis y abscesos cerebrales reportados en niños (Lesens *et al.*, 2000; Blaschke *et al.*, 2007).

Por su parte, *Corynebacterium variabile* ha sido aislada de alimentos como el queso y caracterizada por desarrollar viscosidad en los mismos, tolerancia a altas concentraciones de sal y mínima asimilación de glucosa (Mounier *et al.*, 2007) y aunque en este género se encuentran algunas especies nocivas para humanos y animales, también incluye especies no patogénicas detectadas ampliamente en una diversidad de

hábitats como suelo, material vegetal, aguas residuales y productos lácteos (Ventura *et al.*, 2007).

El género *Pseudomonas* presentó mayor abundancia tanto en larvas con y sin manejo, y representa un grupo de bacterias reconocidas por su extensa diversidad que se han aislado de diferentes especies de insectos (Inglis *et al.*, 2000; Osborn *et al.*, 2002; Adem y Demibag, 2007; Sezen *et al.*, 2007; Behar *et al.*, 2008; Terenius *et al.*, 2008; Reza *et al.*, 2012; Hamidou *et al.*, 2013), que además pueden ser encontradas en distintos ambientes como el suelo, aguas residuales y lodos de depuradoras, o como endófitas (Chowdhury *et al.*, 2004; Ekhaise *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2011).

El género *Enterococcus* sp., aunque anteriormente no era considerado como patógeno en humanos, hoy en día es una causa principal de infecciones intrahospitalarias en todo el mundo y su importancia nosocomial aumentó debido a su capacidad para adquirir resistencia a antimicrobiales, lo que dificulta su tratamiento (Moellering, 1990; Spera y Farber, 1994); este patógeno forma parte de la microbiota intestinal del hombre y animales y puede colonizar tanto la piel como las mucosas del tracto respiratorio superior y genital (Murray, 1997). La descripción se ha hecho a partir de cepas aisladas de humanos y otros mamíferos, aves, insectos y algunos alimentos (Iversen *et al.*, 2002; Juliet, 2002; Cox y Gilmore, 2007; Dillon *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2009; Gayatri *et al.*, 2012; Hamidoun *et al.*, 2013), ya que es capaz de sobrevivir en medios poco enriquecidos como suelo, agua y alimentos (Juliet, 2002).

*Arthrobacter* es un género de bacterias aerobias obligadas que presenta células de forma alargada durante su fase de crecimiento exponencial, mientras que durante la fase estacionaria se observan como cocos; los miembros de este género están ampliamente distribuidos en el ambiente, principalmente en el suelo y se reportan también aislamientos provenientes de fuentes clínicas (Jones *et al.*, 1992; Funke *et al.*, 1996). Algunas especies han sido descritas de cepas obtenidas de orina de humano y cultivos de sangre (Hou *et al.*, 1998; Wauters *et al.*, 2000) y otras parecen tener actividades insecticidas; sin embargo, la virulencia es específica (Ince *et al.*, 2008; Danismazoglu, *et al.*, 2012).

Los organismos pertenecientes al género *Acinetobacter* se encuentran en agua tanto corriente como residual y son muy importantes en el suelo; sobreviven en amplios rangos de temperatura; suelen ser comensales, pero también causan fuertes infecciones en pacientes inmunocomprometidos, comúnmente reportados en hospitales por causar problemas en las vías urinarias, neumonía, bacteriemia y meningitis secundaria; además de ser patógenos oportunistas, se comprobó su presencia en muestras de agua de consumo; así mismo, *Acinetobacter calcoaceticus* muestra gran similitud con aislamientos de cepas clínicas, por lo que posee cierto potencial como agente patógeno (Bergogne y Towner, 1996; Rusin, 1997; Jellison *et al.*, 2001) También son parte de la flora bacteriana de insectos, algunos de ellos entomófagos (Dillon y Dillon, 2004; Adem y Demibag, 2007; Geiger *et al.*, 2009; Hamidou *et al.*, 2013; Minard *et al.*, 2013).

Especies del género *Bacillus* han sido detectadas en termitas que habitan en el suelo y otros invertebrados (König, 2006). Algunas se desarrollan como mutualistas (McSpadden, 2004), se han aislado de insectos tanto vivos como muertos y ciertas cepas de *B. lentimorbus*, *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, son comúnmente reconocidas como entomopatógenos (Stahly *et al.*, 2006) por lo que poseen un amplio potencial para ser utilizadas en el manejo de insectos plaga (Thiery y Frachon, 1997; Charles *et al.*, 2000). Se han aislado diferentes especies (Osborn *et al.*, 2009; Ince *et al.*, 2008; Gokce *et al.*, 2010; Marina *et al.*, 2011; Danismazoglu *et al.*, 2012; Gayatri *et al.*, 2012).

Con base en el hábitat de las bacterias antes mencionadas, se puede atribuir la presencia de los géneros y especies identificados en este estudio, ya que con excepción de la fase adulta, el ciclo de vida del insecto transcurre en el suelo; sin embargo, faltaría identificar a nivel de especie aquellas poblaciones que solo se identificaron a nivel de género.

Además, en el análisis aplicado a los datos obtenidos se observó que influye la procedencia y apariencia de las larvas, ya sean con o sin manejo y aunque es mínima la diferencia de microbiota aislada entre ambas muestras, se demostró que las larvas con manejo presentaron mayor diversidad de géneros y especies y estos fueron más abundantes (Figuras 1.6 y 1.7). Esto sugiere que en condiciones naturales hay una habilidad por parte de la flora bacteriana para impedir el crecimiento de

patógenos. Existen números estudios que han descrito la comunidad bacteriana en el intestino de insectos, pero es poca la información que se tiene sobre el papel biológico que juega esta microbiota (Dillon y Dillon, 2004).

La secuenciación de ácidos nucleicos, particularmente utilizando el gen 16S rRNA, es una herramienta útil que hace posible definir la comunidad microbiana de los insectos (Braumman *et al.*, 2001; De Vries *et al.*, 2001); sin embargo, en ocasiones es necesario apoyarse de otros métodos como Máxima Parsimonia, que a través de la construcción de árboles filogenéticos, nos permitan corroborar los resultados obtenidos.

Por otro lado, por ser el gusano rojo un alimento comestible para el humano, para este estudio era fundamental conocer la calidad sanitaria que puede presentarse en las larvas más contaminadas, de ahí que fue necesario enviar una muestra al laboratorio de Inocuidad Biológica, donde los resultados comprobaron que hubo ausencia de contaminación fecal o condiciones higiénicas inadecuadas provocadas por *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

La microbiota en el intestino del insecto representa en todos los aspectos las interrelaciones que hay como patógenos, simbioses o mutualistas obligados. Por lo anterior, esta investigación contribuyó en la identificación de las bacterias asociadas a larvas de *C. redtenbacheri*; sin embargo, en un contexto ecológico, sería fundamental profundizar

más para conocer cuál es la importancia y la interacción de dichos microorganismos como componentes de su sistema (Steinhaus, 1960).

Aunado a esto, la presencia y distribución de bacterias en el intestino de los insectos es en gran parte influenciada por el pH (Tanada y Kaya, 1993), por lo que para futuras investigaciones se sugiere considerar los valores de pH para cada parte del intestino, además de realizar pruebas de patogenicidad que nos permitan conocer el grado de mortalidad que ocasiona cada una de las bacterias identificadas en este estudio.

En conclusión, para *Comadia redtenbacheri* se determinaron seis géneros y cinco especies de bacterias, aisladas de la parte externa y en el intestino. La flora bacteriana de este insecto puede variar de acuerdo al manejo que se le dé a las poblaciones, lo que sugiere la importancia del cuidado e higiene que se debe tener al momento de extraer y transportar a las larvas, ya que se obtuvo mayor diversidad de bacterias en poblaciones con manejo, y dentro de éstas, las bacterias aisladas presentaron mayor abundancia en larvas consideradas como enfermas.

#### **LITERATURA CITADA**

- Adem, B. A. y Demirbag, Z. 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea lineatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Cellular and Molecular Biology* 62: 13-18.
- Baumhower, A. H., Cantelo, W. W., Hobojold, J. M., Knott, C. M. y Jam Jr., J. J. 1977. An improved method for mass rearing the tobacco hornworm. *United States Agricultural Research Service* 167: 1-13.
- Behar, A., Yuval, B. y Jurkevitch, E. 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and their impact on host longevity. *Journal of Insect Physiology* 54: 1377-1383.

- Bergogne, B. E. y Towner, K. J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology* 9: 148-165.
- Bignell, D. E. 2000. Introduction to Symbiosis, pp. 189-208. En T. Abe, D. E. Bignell y M. Higashi (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic. Dordrecht.
- Blaschke, A. J., Bender, J., Byington, C. L., Korgenski, K., Daly, J. y Petti, C. A. 2007. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Clinic Infectious Diseases* 45: 3-6.
- Brauman, A., Dore, J., Eggleton, P., Bignell, D., Breznak, J. A. y Kane, M. D. 2001. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 27-36.
- Breznak, J. A. 2000. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood and litter feeding termites, pp. 209-232. En Abe, D. E. Bignell y M. Higashi (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic. Dordrecht.
- Breznak, J. A. 2002. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology* 42: 313-318.
- Brooks, M. A. 1963. The microorganisms of healthy insects, pp. 215-250. En E. A. Steinhaus (ed.), *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. Academic. London.
- Brune, A. 1998. Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnology* 16: 16-21.
- Buchner, P. 1965. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Wiley. New York.
- Campbell, B. C. 1990. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects, pp. 1-44. En E. A. Bernays (ed.), *Insect-Plant Interactions*. FL: CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Charles, J. F., Delecluse, A. y Nielsen, L. C. 2000. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Chowdhury, S. P., Khanna, S., Verma, S. C. y Tripathi, A. K. 2004. Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1210-1219.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. y Ait, B. E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685-1693.

- Cox, C. R. y Gilmore, M. S. 2007. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infection and Immunity* 75: 1565-1576.
- Danismazoglu, M., Demir, I., Sevim, A., Demirbag, Z. y Nalcacioglu, R. 2012. An investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members. *Crop protection* 40: 1-7.
- Dasch, G. A., Weiss, E. y Chang, K.P. 1984. Endosymbionts of insects, pp. 811-813. En N. R. Krieg y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore.
- De Vries, E. J., Breeuwer, J. A. J., Jacobs, G. y Mollema, C. 2001. The association of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 120-128.
- Dillon, R. J. y Dillon, V. M. 2004. The gut bacteria of insects nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49: 71-92.
- Dillon, R. J., Webster, G., Weightman, A. J., Dillon, V. M., Blanford, S. y Charnley, A. K. 2008. Composition of acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 265-272.
- Dillon, R. y Charnley, K. 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology* 153: 503-509.
- Ekhaise, F. O. 2004. Isolation of 2-methoxyethanol degrading bacterial isolate *Pseudomonas* sp. strain VB. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 10: 47-53.
- Funke, G., Hutson, R. A., Bernard, K. A., Pfyffer, G. E., Wauters, G. y Collins, M. D. 1996. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2356-2363.
- Gayatri, P. N., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A. y Rajagopal, R. 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* 7(1): e30768. doi: 10.1371/journal.pone.0030768.
- Geiger, A., Fardeau, M., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., Cuny, G., Truc, P. y Ollivier, B. 2009. First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus* and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1364-1370.

- Gokce, C., Sevin, A., Demirbag, Z. y Demir, I. 2010. Isolation, characterization and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: Rhynchitidae). *Biocontrol Science and Technology* 20: 973-982.
- Granados, S. D. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Hallmann, J., Quadt, H. A., Mahaffee, W. F. y Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hamidou, S. I., Simo, G., Njiokou, F., Tchicaya, B., Abd-Alla, M. M. A., Cuny, G. y Geiger, A. 2013. The bacterial flora of tsetse fly midgut and its effect on trypanosome transmission. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: 589-593.
- Hammer, T. J., McMillan, W. O. y Fierer, N. 2014. Metamorphosis of a butterfly associated bacterial community. *PloS ONE* 9:e86995. doi: 10.1371/journal.pone.0086995
- He, C., Nan, X., Zhang, Z. y Li, M. 2013. Composition and diversity analysis of the gut bacterial community of the oriental armyworm, *Mythimna separate*, determined by culture-independent and culture-dependent techniques. *Journal of Insect Science* 13: 1-11.
- Hernández, P., Fayolle, G. F. y Vandecasteele, J. P. 2001. Biodegradation of ethyl *t*-butyl ether (ETBE), methyl *t*-butyl ether (MTBE) and *t*-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 117-121.
- Hogg, J. C. y Lehane, M. J. 2001. Microfloral diversity of cultured and wild strains of *Psoroptes ovis* infesting sheep. *Parasitology* 123: 441-446.
- Hou, X. G., Kawamura, Y., Sultana, F., Shu, S., Hirose, K., Goto, K. y Ezaki, T. 1998. Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. nov., isolated from human urine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 423-429.
- Ince, A. I., Kati, H., Yilmaz, H., Demir, I. y Demirbag, Z. 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. *Microbial Biotechnology* 24: 3005-3015.
- Inglis, G. D., Lawrence, A. M. y Davis, F. M. 2000. Pathogens associated with southwestern corn borers and southern corn stalk borers (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1619-1626.

- Iversen, A., Kuhn, I., Franklin, A. y Möllby, R. 2002. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. *Journal of Clinical Microbiology* 68: 38-42.
- Jellison, T. K., McKinnon, P. S. y Rybak, M. J. 2001. Epidemiology, resistant and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-citastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy* 21: 142-148.
- Jeyaprakash, A., Hoy, A. M. y Allsopp, M. H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 96-103.
- Jones, D. y Keddie, R. M. 1992. The genus *Arthrobacter*, pp. 1283-1299. En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K. M. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Juliet, C. 2002. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. *Revista Chilena de Infectología* 19: 1-5.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Rada, V., Dubná, S. y Marounek, M. 2010. Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. *Anaerobe* 16: 165-170.
- King, E. G. y Hartley, G. G. 1992. Propagation and release of natural enemies for control of cotton insect and mite pest in the United States. *Crop Protection* 11: 497-506.
- König, H. 2006. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *Journal of Applied Microbiology* 101: 620-627.
- Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C. y Miller, T. A. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology* 42: 290-294.
- Lee, H. A., Husseneder, C. y Hooper, B. L. 2008. Culture-independent identification of gut bacteria in fourth-instar red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 20-33.
- Lesens, O., Hansmann, Y., Riegel, P., Heller, R., Benaissa, D. M. y Martinot, M. 2000. Bacteremia and endocarditis caused by a *Gordonia* species in a patient with a central venous catheter. *Emerging Infectious Diseases* 6: 2-5.
- Lysenko, O. 1985. Non-spore forming bacteria pathogenic to insects: incidence and mechanisms. *Annual Review of Microbiology* 39: 673-695.
- Marina, M. G., Ju, Y., Lai, C., Chacko, M. D. y Chen, H. C. 2011. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb

- of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists. *Microbiology Ecology* 79: 504-517.
- Martínez, F. A. P., Durbán, A., Latorre, A., Antón, J. y Marcos, G. M. 2011. Bacteria associated with *Copestylum* (Diptera: Syrphidae) larvae and their cactus host *Isolatocereus dumortieri*. *PLoS ONE* 11:e27443. doi: 10.1371/journal.pone.0027443.
- Mckinley, D. J. 2004. An introduction to the use and preparation of artificial diets with special emphasis on diets for phytophagous *Lepidoptera*. *International Journal of Pest Management* 17: 421-424.
- McLaughlin, R. E. y Sikorowski, P. P. 1978. Observations of boll weevil midgut when fed natural food or on bacterially contaminated artificial diet. *Journal of Invertebrate Pathology* 32: 64-70.
- McSpadden, G. B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94:152-158.
- Minard, G., Hélène, T. F., Nantenaina, R. F., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P. y Valiente, M. C. 2013. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *Microbiology Ecology* 83: 63-73.
- Moellering, R. C. 1990. The enterococci: an enigma and a continuing therapeutic challenge. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9: 3-4.
- Mounier, J., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Fitzgerald, G. F. y Cogan, T. M. 2007. Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7732-7739.
- Murray, B. E. 1997. Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine* 102: 84-93.
- NCBI.2014. Basic Local Alignment Search Tool. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Osborn, F., Berlioz, L., Vitelli, F. J., Monsalve, W., Dorta, B. y Rodríguez, L. V. 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 7-12.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Cooke, S. M., Fusing, V., Poulsen, L. K. y Breznak, J. A. 1996. Phylogeny of not yet cultured spirochetes from termite guts. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 347-352.

- Payne, R.W., Harding, S. A., Murray, D. A., Soutar, D. M., Baird, D. B., Welham, S. J., Kane, A. F., Gilmour, A. R., Thompson, R., Webster, R. y Tunnicliffe, W. G. 2005. The Guide to Genstat Release 8: Statistics Part 2. VSN International, Oxford, UK.
- Peloquin, J. J. y Greenberg, L. 2003. Identification of midgut bacteria from fourth instar red imported fire ant larvae, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 20: 157-164.
- Reza, C. A., Ali, O. M., Vatandoost, H., Reza, P. M., Raeisi, A., Ali, E. A., Mardani, N. y Ghoorchian, S. 2012. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: A step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Tropica* 121: 129-134.
- Rosenblueth, M. y Martínez, R. M. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *The American Phytopathology Society* 19: 827-837.
- Rusin, P. A. 1997. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 152: 57-83.
- Ryu, E. 1940. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* 17: 58-63.
- Schulz, B. y Boyle, C. 2006. What are endophytes? Microbial root endophytes. *Soil biology* 9: 1-13.
- Seeley, H. W. Jr., Van Demark, P. J. y Lee, J. J. 1991. *Microbes in Action: a Laboratory Manual of Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Sezen, K., Demir, I. y Demirbag, Z. 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockcher, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 35: 79-85.
- Sikorowski, P. P. y Thompson, A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 77: 283-285.
- Sikorowski, P. P. y Lawrence, A. M. 1994. Microbial contamination and insect rearing. *American Entomologist* 40: 240-253.
- Spera, R. V. y Farber, B. F. 1994. Multidrug resistant *Enterococcus faecium*. An intreatable nosocomial pathogen. *Drug* 48: 78-88.
- Stahly, D. P., Andrews, R. E. y Younsten, A. A. 2006. The genus *Bacillus* insect pathogens, pp. 563-608. *En M. Dworkin y S. Falkow (eds.), The Prokaryotes*. Springer, Singapore.

- Steinhaus, E. A. 1960. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. *Bacteriological Reviews* 24: 65-73.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tanada, Y. y Kaya, H. K. 1993. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms, pp. 12-51. En Y. Tanada y H. Kaya (eds.), *Insect Pathology*. Academic. New York.
- Terenius, O., Dantas, C., Dasso, P. W., Wanderli, P. T., Amade, J. A. y Marinotti, O. 2008. 16S rRNA Gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingui* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 45: 172-175.
- Thiery, I. y Frachon, E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, pp. 55-73. En A. L. Lacey (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. London.
- Toth, E., Kovacs, G., Schumann, P., Kovacs, A. L. y Steiner, U. 2001. *Schineria larvae* gen. nov., sp nov., isolated from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> larval stages of *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 401-407.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. y Sinderen, D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology* 71: 495-548.
- Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M. y Delmeé, M. 2000. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2412-2415.
- Xue, Y., Xuesong, X., Zhou, X. R., Liu, R., Liang, F. y Ma, Y. 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 53: 1643-1646.
- Yoshiyama, M. y Kimura, K. 2009. Bacteria in the gut of japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 91-96.
- Zhang, Z. Q., He, C. y Li, M. L. 2014. Analysis of intestinal bacterial community diversity of adult *Dastarcus helophoroides*. *Journal of Insect Science* 14: 1-13.

## **CAPITULO 2. HONGOS AISLADOS DE PUPAS DE *Comadia redtenbacheri* HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE)**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

### **RESÚMEN**

Se estudiaron los hongos presentes en pupas del gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). Los tratamientos fueron mantenidos en laboratorio tanto a temperatura ambiente como en condiciones de  $20\pm 5$  °C de temperatura, 40-50% de humedad y oscuridad constante, además de proporcionar humedad a una parte de los tratamientos. Con base en su caracterización morfológica, se determinaron seis morfotipos, cuatro de los cuales se agruparon dentro del género *Rhizopus*, uno en *Beauveria* y otro más en el género *Penicillium*. Los hongos que se identificaron fueron más abundantes en los tratamientos mantenidos con humedad, donde también se observó que un gran porcentaje de la población no presentó emergencia de adultos.

**Palabras clave:** humedad, temperatura, contaminación microbiana, cría en laboratorio, emergencia de adultos.

## **CHAPTER 2: FUNGI ISOLATED FROM *Comadia redtenbacheri***

### **HAMMERSCHMIDT (LEPIDOPTERA: COSSIDAE) PUPAE**

Lorena Hernández Flores, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

#### **ABSTRACT**

The fungi present in pupae of the agave red worm *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae) were studied. Treatments in the laboratory were kept at temperature  $20\pm 5$  °C, relative humidity and constant darkness; also moisture was added to part of the treatments. Based on morphological characterization, six morphotypes were identified; four were grouped in the genus *Rhizopus*, one in *Beauveria* and one in *Penicillium*. Of the identified fungi, those in treatments maintained with added moisture were the most abundant. Moreover, in these treatments it was observed that a large percentage of the population did not emerge as adults.

**Key words.** Moisture, temperature, microbial contamination, laboratory rearing, adult emergence.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

La cría masiva de insectos es el primer paso para estudiarlos, ya que se necesitan grandes cantidades de ellos para poder sustentar investigaciones acerca de su biología, fisiología y comportamiento, evaluar su respuesta a los agentes de control químico y biológico (Abbasi *et al.*, 2007; Strett *et al.*, 2008), en la investigación biotecnológica (Murúa *et al.*, 2003) y en la alimentación humana (Defoliart, 1999). Los estudios realizados sobre metabolismo, nutrición y comportamiento, se reducen a un pequeño grupo de insectos (King, 1993).

Sin embargo, la contaminación microbiana es uno de los principales problemas en los sistemas de cría masiva de insectos. Los cambios de dieta, temperatura y humedad, son factores estresantes a los que son sometidos los insectos y algunas toxinas se ven favorecidas con estos cambios, multiplicándose en los tejidos de hospederos ya debilitados y causando la muerte (Sikorowski y Lawrence, 1994).

Los efectos de la contaminación microbiana en el desarrollo de insectos son influenciados por las especies de microorganismos presentes, etapa y edad del insecto al momento de la contaminación, así como por algunos factores bióticos, además de que debido a las condiciones controladas bajo las cuales se desarrollan estos sistemas de cría, las dietas son fácilmente deterioradas por efecto de algunos microorganismos, los cuales alteran su valor nutritivo (Singh y House, 1970; Childress y Williams, 1973; Bell *et al.*, 1981; Sikorowski *et al.*,

2001; Alverson y Cohen, 2002; Strett *et al.*, 2008). Otros efectos de la contaminación pueden ser la reducción en el tamaño de los insectos, retraso en su desarrollo, disminución de la producción de feromonas y de los niveles de ácidos grasos y aminoácidos, lo que puede ocasionar finalmente la muerte del insecto (MacGown y Sikorowski, 1980; Sikorowski y Thompson, 1984; Sikorowski *et al.*, 1992).

Diversos estudios documentan la contaminación de dietas artificiales por el crecimiento y formación de hongos (Hoover *et al.*, 1997; Arévalo y Zenner, 2010). Desde 1962, Ouye *et al.*, reportaron la presencia de *Aspergillus niger* y *A. flavus*, en una dieta utilizada en la cría de *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Noctuidae); de igual manera, en 1981 Bell *et al.*, encontraron *A. niger*, *A. flavus*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizopus nigricans*, contaminando la dieta de *Heliothis* spp. Además de los anteriores, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y algunas levaduras, son organismos frecuentemente asociados a los sistemas de cría de insectos (Shapiro, 1984; Baumhower *et al.*, 1977).

En *Comadia redtenbacheri* se ha reportado la disminución de la emergencia de adultos por la presencia de microorganismos principalmente durante la fase de pupación, por lo que el aislar e identificar taxonómicamente a los hongos presentes durante esta etapa de su desarrollo, permitirá optimizar el manejo de las poblaciones que son destinadas a la obtención de adultos.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología de Insectos del Postgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

### **Obtención de muestras**

La población de larvas estudiadas fue adquirida a partir de vendedores de distintas localidades del Estado de Hidalgo (Tulancingo, Tizayuca, Tlahuelilpan y Pozos), las cuales eran mantenidas en condiciones de laboratorio para la obtención de adultos; sin embargo, debido a la contaminación por hongos, se afectó el desarrollo de las pupas.

Para la pupación, se utilizó el procedimiento empleado por Miranda *et al.* (2013), que consistió en ubicar a las larvas individualmente en tubos de poliducto de 10 cm de longitud y 3.18 cm de diámetro, mismos que fueron colocados en recipientes de plástico, cada uno con capacidad para 50 tubos. Cada tubo contenía una mezcla de suelo y vermiculita a partes iguales hasta la mitad de su longitud. Mediante un irradiador y un humidificador, los tratamientos se mantuvieron las 24 h en oscuridad, con una humedad relativa de 40-50%, a  $20\pm 5$  °C, mientras que otra parte de los tratamientos se mantuvieron a temperatura ambiente. A los tratamientos con humedad se les aplicaron 100 mL de agua por recipiente cada tres semanas, con un atomizador.

El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo al Manual de Técnicas en Patología de Insectos (Lawrence, 1997) y Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos (Cañedo y

Ames, 2004). Una vez que terminó la emergencia de los adultos de *C. redtenbacheri*, un total de 917 puparios de los que no emergieron los adultos, fue abierto para extraer manualmente a las larvas muertas, mismas que se separaron y catalogaron en cinco grupos según su color y consistencia (Fig. 2.1).

### **Incubación de larvas en cámara húmeda**

De cada grupo se seleccionó de manera aleatoria una submuestra de 15 individuos. Cada larva fue introducida en Hipoclorito de Sodio (0.5% del producto activo) durante cinco minutos, se sacó y enjuagó de tres a cuatro veces con agua destilada estéril y se introdujo en una cámara húmeda que consistió en una caja Petri esterilizada donde se colocó papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril, se selló la caja con Parafilm® y se dejó incubar a temperatura ambiente durante siete días (Fig. 2.2).

### **Aislamiento de hongos**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación y bajo condiciones asépticas, con una asa de siembra se tocó levemente al insecto donde se observaba crecimiento fungoso y se esparció en forma de estriado en cajas Petri con medio de cultivo Agar-Dextrosa-Sabouraud®, para incubar nuevamente por 72 horas bajo condiciones de laboratorio (Fig. 2.3 a y b).

### **Caracterización morfológica**

Los cultivos resultantes fueron utilizados para llevar a cabo la caracterización morfológica, mediante la descripción de la colonia y las

estructuras del hongo, que permitieron la correcta identificación de éste.

Para la descripción de la colonia se procedió a cortar con ayuda de una aguja de disección, un círculo pequeño del cultivo en formación, el cual fue transferido al centro de una placa nueva que contenía medio de cultivo antes mencionado (Fig. 2.4), mismo que se mantuvo por dos semanas a 20 °C en una incubadora (Lab-Line Instruments, Inc.® Melrose Park, Illinois, USA), para observar las características morfológicas de la colonia, su aspecto, textura, coloración en ambas caras, presencia o no de pigmentos y velocidad de crecimiento en el substrato de cultivo a partir de la medición del diámetro.

### **Identificación de hongos**

La descripción del hongo se realizó a través de la observación microscópica de sus estructuras, para lo que fue necesario realizar una tinción. A partir del cultivo y con una hoja de bisturí estéril, se cortó una pequeña porción del hongo que se colocó sobre una lámina portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se introdujo en una cámara húmeda como la mencionada en el capítulo anterior (Fig. 2.5). De igual manera, fue necesario incubar de tres a cuatro días a temperatura ambiente, para permitir la formación de conidios que son necesarios para su identificación según las claves sistemáticas de Barnett y Hunter (1998). Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la lámina de la cámara húmeda, se limpió la superficie inferior y una vez seca se añadió una gota de azul de lactofenol entre el porta y el

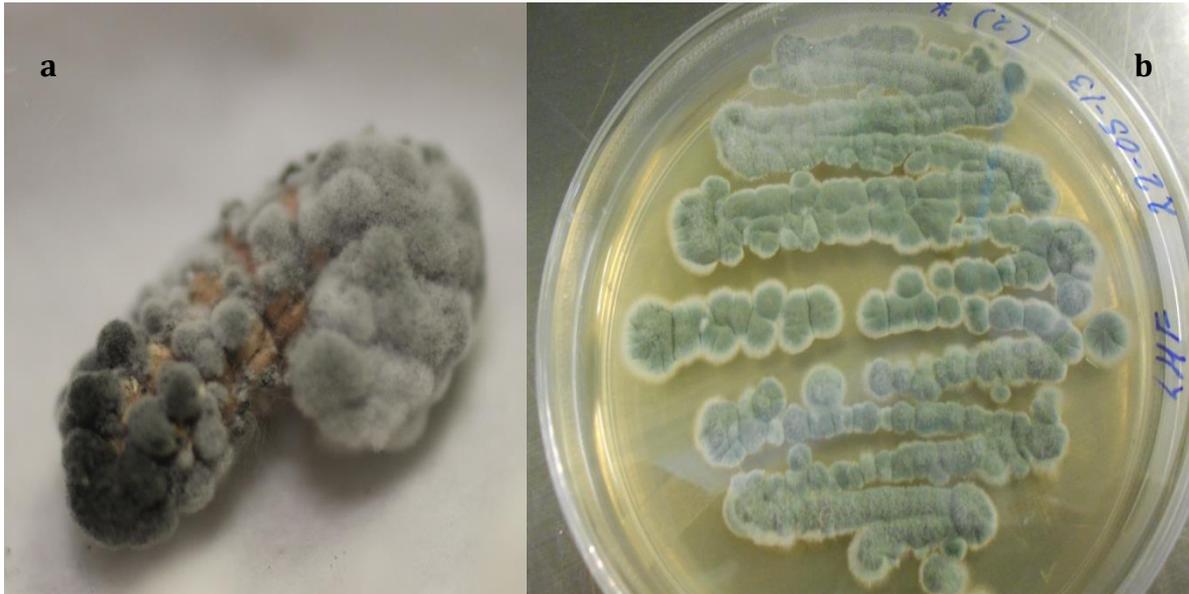
cubreobjetos, se fijó la muestra pasándola varias veces por encima de la flama del mechero y se procedió a la observación de las estructuras en el microscopio óptico (Carl Zeiss® Göttingen, Germany).



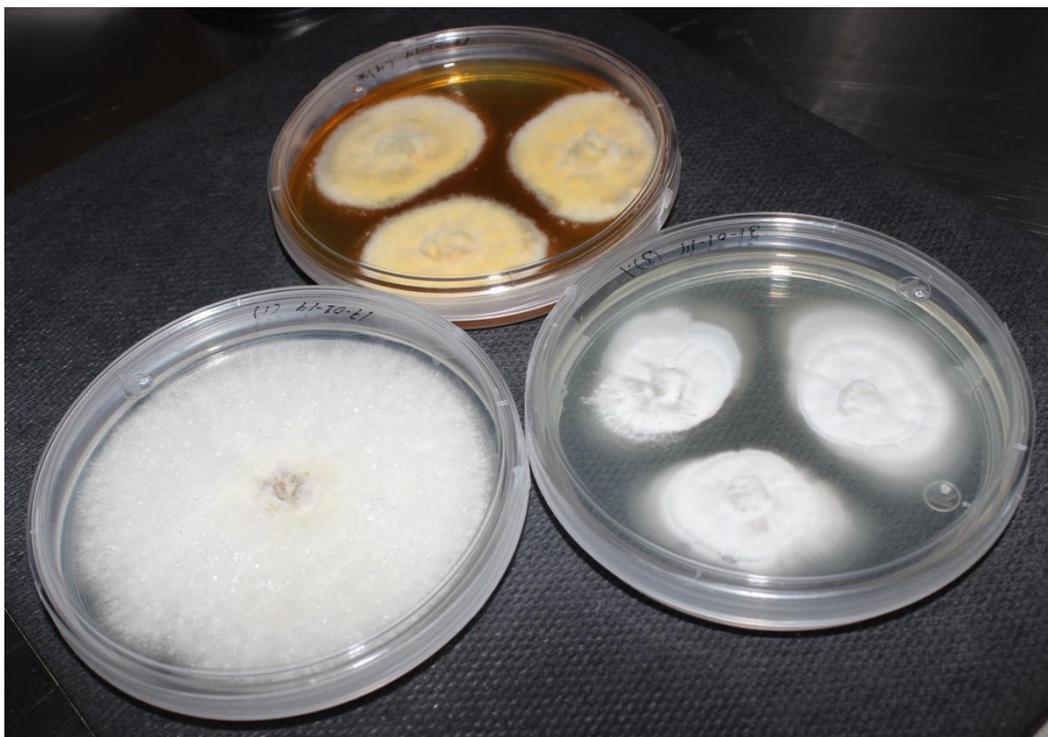
**Figura 2.1.** Separación en grupos de larvas muertas extraídas de capullos.



**Figura 2.2.** Incubación de larvas en cámara húmeda.



**Figura 2.3.** Aislamiento de hongos a partir de su crecimiento sobre larvas.



**Figura 2.4.** Caracterización morfológica de hongos aislados.



**Figura 2.5.** Observación microscópica para la identificación de hongos aislados de *C. redtenbacheri*.

### 2.3 RESULTADOS

Se analizaron los hongos presentes en 75 larvas muertas de *C. redtenbacheri*, aisladas de las cinco muestras diferentes (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Características de larvas muertas extraídas de puparios.

Submuestra	Características de larva
<b>A</b>	Larvas de consistencia dura, olor intenso, coloración café.
<b>B</b>	Larvas de consistencia dura, color café,
<b>C</b>	Larvas de consistencia blanda, color negro, olor intenso.
<b>D</b>	Larvas de consistencia dura, coloración rosa, sin olor.
<b>E</b>	Larvas de consistencia dura, color café claro.

#### Caracterización morfológica

De cada submuestra se aisló un morfotipo de hongo, según las características de crecimiento observadas sobre la larva; sin embargo,

se registraron seis morfotipos, debido a que en la submuestra catalogada como “D”, se encontró la asociación de dos hongos sobre la misma larva (Morfotipos 4 y 5).

Aunque se obtuvieron de diferentes submuestras, los Morfotipos 1, 2, 3 y 6, quedaron finalmente agrupados dentro del género *Rhizopus* sp., con base en las características descritas por las claves de Barnett y Hunter (1998), determinando así, solo tres géneros (Cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2.** Descripción de hongos aislados de larvas muertas de *Comadia redtenbacheri*.

Aislamiento	Características	Género
<b>Morfotipo 1</b>	Hongo filamentoso.	<b><i>Rhizopus</i> sp.</b>
<b>Morfotipo 2</b>	Produce esporas asexuales y sexuales.	
<b>Morfotipo 3</b>	A partir de un gran nudo de rizoides	
<b>Morfotipo 6</b>	crecen esporangióforos erectos sin ramificar (color pardo oscuro), que soportan al esporangio mediante una columela apofisada. E孢angios esféricos y negros, producen esporangiosporas asexuales. Micelio algodonoso, denso y aéreo.	
<b>Morfotipo 4</b>	Micelio blanco o ligeramente coloreado con vello blanco, de apariencia polvosa. Conidióforos solitarios, agrupados irregularmente, en racimos verticilados, en forma geniculada o zigzag. Desarrolla conidios unicelulares, hialinos, globosos u ovoides. Células conidiógenas en forma de matraz. Colonias de crecimiento lento, de color blanco al principio, que con frecuencia	

---

se vuelven amarillas.

**Morfotipo 5** Hongo filamentoso.

A partir del micelio surgen conidióforos rectos, hialinos, formando verticilios.

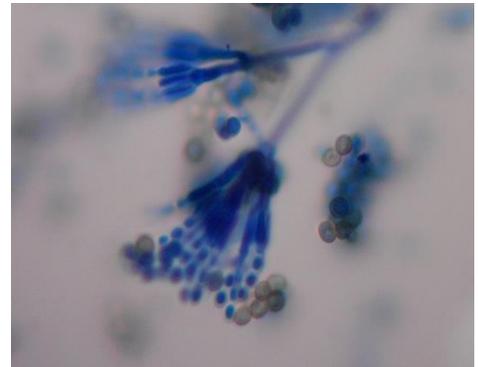
Células conidiógenas llamadas fiálides, nacen directamente de la hifa o sobre métulas.

Conidias hialinas o de colores brillantes, globosas u ovoides, se presentan en cadenas de basipetos.

Colonias planas, aterciopeladas, polvosas, algodonosas, inicialmente de aspecto blanco que se torna verde-azul, verde-gris o verde-amarillo.

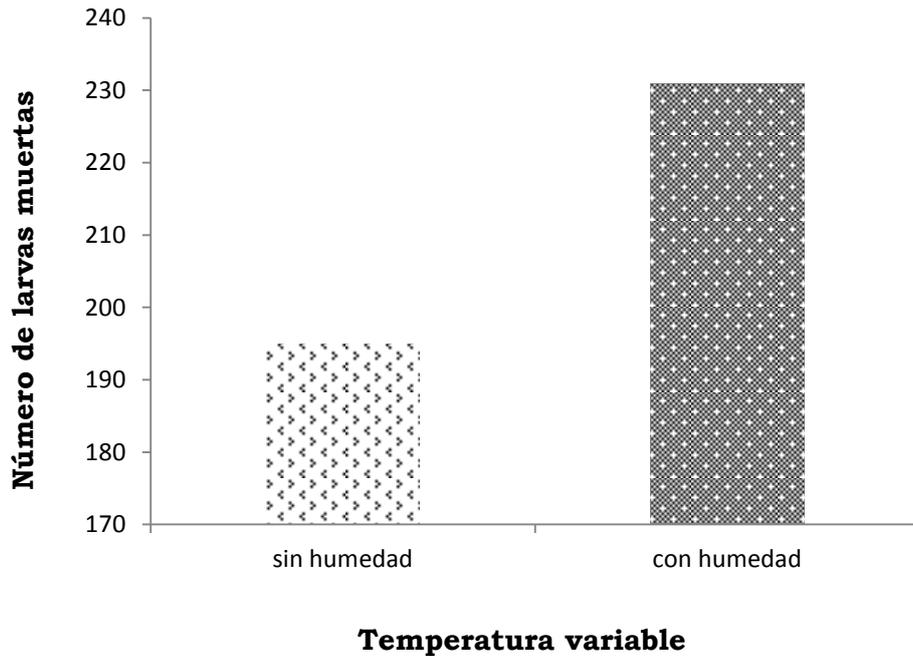
---

***Penicillium* sp.**



La Figura 2.6 muestra el número de larvas muertas obtenidas de la población de puparios que se mantuvo en el laboratorio, con humedad y temperatura variable, el 77% no presentó emergencia de adultos, donde el género *Rhizopus* sp. presentó la mayor abundancia con 73%, seguido de *Beauveria* sp. y *Penicillium* sp. con 27%, aunque cabe mencionar que estos últimos géneros se encontraban asociados en la misma larva.

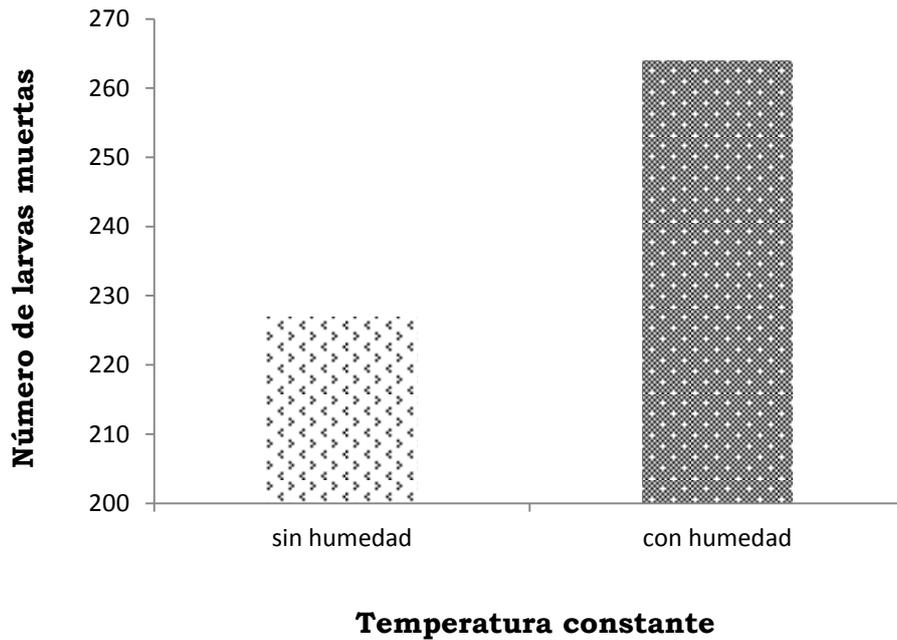
Por otro lado, en los puparios mantenidos sin humedad y con temperatura variable, aunque hubo mayor emergencia de adultos, el 65% de las larvas no terminó su desarrollo. De igual manera, el género *Rhizopus* sp. fue el más abundante (76%), y se identificó a *Beauveria* sp. y *Penicillium* sp. con el 24% de abundancia.



**Figura 2.6.** Número de larvas muertas de *C. redtenbacheri*, en tratamientos que fueron mantenidos en el laboratorio a temperatura variable.

Sin embargo, en puparios que se conservaron con una temperatura constante (Fig. 2.7), se presentó mayor mortalidad de la población, aún sin presentar humedad, ya que el 76% de las larvas no emergió, en estos tratamientos se aisló el género *Rhizopus* sp. con 67% de abundancia, y el 33% para *Beauveria* sp. y *Penicillium* sp.

Con la misma temperatura, pero aplicando humedad a los puparios, el 88% de las larvas murieron sin terminar su desarrollo. Dicha humedad favoreció nuevamente el crecimiento del hongo *Rhizopus* sp. (81% de abundancia).



**Figura 2.7.** Número de larvas muertas de *C. redtenbacheri*, en tratamientos que fueron mantenidas en el laboratorio a temperatura constante.

## 2.4 DISCUSIÓN

Los principales hongos aislados en larvas muertas de *C. redtenbacheri* mantenidas en el laboratorio, fueron determinados en tres géneros, siendo *Rhizopus* sp. el género más abundante, el cual presenta crecimiento rápido y aspecto muy consistente y se sabe que sobrevive en una amplia gama de temperaturas y humedades relativas. La especie *R. stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Vuillemin es de las más frecuentes y ampliamente distribuida en la naturaleza, sobrevive de manera saprofita en el suelo, residuos orgánicos y excrementos de animales, con amplio potencial para desarrollarse e invadir tejidos vegetales, además de que es considerado como uno de los principales fitopatógenos en enfermedades postcosecha y como agente causal de pudrición de frutas y hortalizas (Adaskaveg *et al.*, 2002; Northover y

Zhou, 2002; Nelson, 2005; Hernández *et al.*, 2006; Velázquez del Valle *et al.*, 2008), además de ser aislado en dietas artificiales utilizadas para la alimentación de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Noctuidae) y *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Tijerina, 1997; Trivedy *et al.*, 2011).

Por su parte, el género *Penicillium* sp., es considerado cosmopolita y generalista, con aproximadamente 225 especies, la mayoría encontradas en el suelo, materia orgánica en descomposición, granos almacenados, frutas y vegetales y otros materiales, prevaleciendo en regiones donde las temperaturas son bajas (Christensen *et al.*, 2000; Pitt, 2000; Samson *et al.*, 2004; Domsch *et al.*, 2007); sus propiedades bioquímicas han sido estudiadas ampliamente desde su descubrimiento en 1929 (Chalfoun y Batista, 2003). Es el agente de contaminación más común, debido a que sus esporas se dispersan a través del aire (Richardson y Warnock, 2003) y al ser inhaladas se puede producir Peniciliosis en individuos debilitados, que se caracteriza por ser una enfermedad pulmonar que se puede propagar a través de la sangre, afectando el líquido cefalorraquídeo, los riñones y el endocardio (Kern y Blevins, 1999); además es un agente causal de infecciones en las vías respiratorias, en personas inmunocomprometidas e inmunodeprimidas (Silva, 1983; Pitt, 1994; Carmo *et al.*, 2007; Lobato *et al.*, 2009).

Algunos autores reportan que muchas especies de *Penicillium* sp. producen micotoxinas, sin embargo la importancia de estos compuestos tóxicos varía ampliamente y se rige tanto por la biología como por la

ecología de las especies en cuestión, así como por la toxicidad de cada compuesto (Samson y Pitt, 2000; Dighton, 2003; Esquivel *et al.*, 2003; Domsch *et al.*, 2007). También es considerado como un hongo de almacén, debido a que causa diferentes daños durante el desarrollo de los granos almacenados, provocando la pérdida de capacidad de germinación, calentamiento y decoloración (Moreno, 1987, 1988; Tequida *et al.*, 2002). Así mismo, se han reportado altos porcentajes de contaminación por hongos pertenecientes a este género, en unidades experimentales que llevan a cabo crías masivas de insectos (Castillo *et al.*, 1994; Tijerina, 1997; Boquin, 2002; Arévalo y Zenner de Polanía, 2010; Zambrano, 2013; Bacca y Benavides, 2014).

Asociado a *Penicillium* sp., se encontró el género *Beauveria* sp. Las especies pertenecientes a este género se han reportado como patógenos de insectos y son utilizadas en control biológico, siendo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin la especie más utilizada para este fin, desde su descubrimiento en 1834 como causante de la enfermedad conocida como muscardina blanca y desde entonces su uso como agente entomopatígeno ha tenido un desarrollo muy importante. De distribución cosmopolita, se encuentra comúnmente en el suelo, de manera superficial o endófito de plantas como el maíz, papa, tomate, café, cacao, etc. Además, existe una amplia gama de literatura sobre insectos susceptibles a la infección por *B. bassiana*, con capacidad de infectar a más de 700 especies de artrópodos, entre los que destacan los insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera,

Hemiptera, Orthoptera, Isoptera y Thysanoptera, muchos de los cuales son plagas agrícolas; de igual manera, se ha reportado su efectividad para el control de adultos del género *Aedes* spp. y *Anopheles* spp., y también se ha aislado durante el desarrollo de metodologías para la crianza en el laboratorio de algunos insectos de interés (Quattlebawm y Carner, 1980; Barrera *et al.*, 1987; Moore y Prior, 1988; Méndez, 1990; Sikorowski y Lawrence, 1994; Bustillo *et al.*, 1996; Tijerina, 1997; García *et al.*, 1999, 2002; Trinci *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Carballo *et al.*, 2004; Posada y Vega, 2005; Acosta, 2006; Solís *et al.*, 2006; Safavi *et al.*, 2007; Chacón *et al.*, 2009; Ezzati *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010; Ocampo *et al.*, 2011; Trivedy *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2013; Nussenbaum, 2014).

Los géneros antes mencionados poseen una estrategia de transmisión, produciendo fases infectivas que son liberadas al ambiente cuando muere el hospedante y tienen la capacidad de entrar en estado de diapausa o letargo, permaneciendo latentes hasta encontrar nuevos hospedantes (Ewald, 1995), lo que aunado a la capacidad que tienen de vivir saprotróficamente en el suelo, podría ser la causa principal de los altos porcentajes de infecciones de insectos que habitan sobre o debajo de él, en particular para *C. redtenbacheri*, insecto que durante el último estado larval sale del agave para pupar en el suelo (Almanza, 2007, Llanderal *et al.*, 2007), ya que las características porosas del suelo y el alto contenido de recursos orgánicos, lo convierten en un gran

reservorio de las fases infectivas de los hongos, lo que hace más susceptibles a las larvas que elaboran su capullo de este mismo material, ya sea en su hábitat natural o en las crías mantenidas en el laboratorio.

Por otro lado, Miranda y colaboradores en el 2013, reportaron que la humedad no tenía un efecto significativo sobre la pupación y emergencia de adultos de *C. redtenbacheri*, sin embargo, como se observó anteriormente, en los puparios que se mantuvieron con humedad, se registró mayor número de larvas muertas y se ha reportado que factores como la humedad y temperatura, entre otros, determinan el desarrollo celular fúngico (Rodríguez del Valle, 1983; Betancourt *et al.*, 1985; Szaniszló, 1985; Guzmán, 2002).

En conclusión, para *C. redtenbacheri* se determinaron los géneros de hongos *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. y *Beauveria* sp., aislados de tratamientos mantenidos en el laboratorio, con mayor diversidad de estos en las poblaciones que se desarrollaron con aplicación de humedad. El género *Beauveria* sp. es el único considerado como patógeno de insectos.

Lo anterior sugiere la necesidad de un control sanitario en todo el sistema de cría y una variación de la temperatura, así como no añadir humedad a los tratamientos durante el proceso, evitando así la eliminación de organismos en las unidades experimentales por causa de la contaminación con hongos.

## 2.5 LITERATURA CITADA

- Abbasi, B., Ahmed, K., Khalique, F., Ayub, N., Liu, H., Kazmi, S. y Aftab, M. 2007. Rearing the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* on tapioca based artificial diet. *Journal of Insect Science* 7: 1-7.
- Acosta, V. J. A. 2006. Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Adaskaveg, J. E., Förster, H., y Sommer, N. F. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops, pp. 163-195. En A. Kader (ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Oakland, California, USA.
- Almanza, V. E. I. 2007. Establecimiento de larvas de *Comadia redtenbacheri* Hamm. en plantas de maguey en invernadero. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.
- Alverson, J. y Cohen, A. C. 2002. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology* 95: 256-260.
- Arévalo, M. H. y Zenner de Polanía, I. 2010. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (Fr.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 13: 163-173.
- Bacca, T. y Benavides, M. P. 2014. Evaluación de temperaturas y diferentes estados biológicos de broca de café para la cría masiva del parasitoide *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae). *Boletín Científico del Museo de Historia Natural* 18: 175-187.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA.
- Barrera, J. F., Baker, P. S., Schwarz, A. y Valenzuela, J. E. 1987. Control biológico de la broca del café, mediante parasitoides: Problemas y Perspectivas, IICA, X Seminario sobre Caficultura Latinoamericana. PROMECAFE. Tapachula, México.
- Baumhower, A. H., Cantelo, W. W., Hobojold, J. M., Knott, C. M. y Jam Jr., J. J. 1977. An improved method for mass rearing the tobacco hornworm. *United States Agricultural Research Service* 167: 1-13.

- Bell, J. V., King, G. E. y Hamalle, J. R. 1981. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis* spp. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 243-248.
- Betancourt, S., Torres, B. L. J. y Rodríguez del Valle, N. 1985. Molecular and cellular events during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 23: 207-218.
- Boquin, K. G. J. 2002. Estudios de crianza masiva de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en laboratorio. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola El Zamorano. Carrera de Ciencia y Producción Agrícola. Honduras.
- Bustillo, P. A. E., Orozco, H. J., Benavides, M. P. y Portilla, R. M. 1996. Producción masiva y uso de parasitoides para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia. *Cenicafé (Colombia)* 47: 215-230.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- Carballo, M., Hidalgo, E., Rodríguez, A. 2004. Control biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos, pp. 33-54. En M. Carballo y F. Guharay (eds.), Control biológico de plagas agrícolas. CATIE. Managua.
- Carmo, E. S., Belém, L. F., Catão, R. M. R., Lima, E. O., Silveira, I. L. y Soares, L. H. M. 2007. Microbiota fúngica presente en diversos sectores de un hospital público en Campina Grande. *Revista Brasileira de Análisis Clínicos* 29: 213-216.
- Castillo, P., Narváez, C. y Rizo, C. 1994. Procedimiento para la crianza masiva de insectos noctuidos. Compu-Vaughan. León, Nicaragua.
- Chacón, C. Y., Garita, R. C., Vaglio, C. C. y Villalba, V. V. 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en el laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en Marcha* 22: 28-37.
- Chalfoun, S. M. y Batista, L. R. 2003. Fungos asociados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium*. Governo do Estado de Minas Gerais. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Embrapa Informação Tecnológica, Brasil.

- Childress, D. y Williams, P. P. 1973. Control of a bacterial contaminant of boll weevil diet. *Journal of Insect Physiology* 66: 554-555.
- Christensen, M., Frisvad, J. C. y Tuthill, D. E. 2000. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes, pp. 309-321. En R. A. Samson y J. I. Pitt (eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Harwood Academic Publishers. London.
- Defoliart, G. R. 1999. Insects as food. *Annual Review of Entomology* 44: 21-50.
- Dighton, J. 2003. Fungal interactions with humans, pp. 305-390. En J. Dighton (ed.), *Fungi in Ecosystems Processes*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T. H. 2007. *Compendium of Soil Fungi*. 2<sup>nd</sup> Ed. IHW-Verlag. The Netherlands.
- Dubey, P., Ray, P. y Pandey, A. K. 2010. First record of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. on *Zygogramma bicolorata* Pallister, a biocontrol agent of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Plant Protection Research* 50: 53-55.
- Esquivel, P., Mangiaterra, M., Giusiano, G. y Sosa, M. A. 2003. Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín Micológico* 18: 21-28.
- Ewald, P. W. 1995. The evolution of virulence: A unifying link between parasitology and ecology. *Journal of Parasitology* 81: 659-669.
- Ezzati, T. R., Talaei, H. R. y Hamid, R. P. 2009. Effect of formulating of *Beauveria bassiana* conidia on their viability and pathogenicity to the onion thrips, *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Plant Protection Research* 49: 97-105.
- García, G. C., Medrano, R. H., Piedra, S., Morales, C. S. y Hernández, V. V. 1999. Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Southwestern Entomologist* 24: 225-259.
- García, G. C., Ochoa, M. L. A., Medrano, H. y Segovia, V. 2002. Spray dried microencapsulated formulation of *Beauveria bassiana* for control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 27: 105-109.
- Guzmán, G. 2002. Observaciones sobre la ecología de los hongos, en especial de los micromicetos, pp. 69-86. En L. J. T. Méndez, R. L.

- Martínez y H. F. Hernández (eds.), Actualidades en Micología Médica. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Hernández, L. A. N., Bautista, B. S., Velázquez, D. M. G., y Trejo, E. J. L. 2006. Identification of *Rhizobium stolonifer* Ehrenb. (Ex. Fr.) Lind, causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 65-69.
- Hoover, K., Schultz, C. M., Lane, S. S., Bonning, C. B., Hammock, D. B. y Duffey, S. S. 1997. Effects of diet-age and streptomycin on virulence of *Autographa californica* M. nucleopolihedrovirus against the Tobacco Budworm. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 46-50.
- Howard, A. F., N'Guessan, R., Koenraadt, C. J., Asidi, A., Farenhorst, M., Akogbeto, M., Knols, B. G. y Takken, W. 2010. First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria Journal* 10: 1-24.
- Kern, M. E. y Blevins, K. S. 1999. Micología Médica. 2ª Ed. Editora Premier. Brasil.
- King, F. G. 1993. Augmentation of parasites and predators for suppression of arthropod pest, pp. 90-100. En R. D. Lumsden y J. L. Vaum (eds.), Conference Proceeding series.
- Lawrence, A. L. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Initial handling and diagnosis of diseased insects. Academic Press. USA.
- Lobato, R. C., Varga, V. S. y Silveira, E. S. 2009. Sazonalidade e Prevalência de Fungos Anemófilos em Ambiente Hospitalar no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba* 22: 21-28.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6: 252-255.
- MacGown, M. W. y Sikorowski, P. P. 1980. Histopathology of midgut of mass reared, irradiated boll weevils contaminated with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp. *Journal of Economic Entomology* 73: 81-97.
- Martínez, G. N., González, R., García, G. C., Solis, A., Medrano, H. 2000. Susceptibilidad de "Conchuela del Frijol" a cepas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces*

*fumosoroseus*, producidas en medio líquido. En Memorias XXIII Congreso Nacional de Control Biológico Guanajuato, México.

- Méndez, L. I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Miranda, P. K., Llanderal-Cázares, C., De los Santos Posadas, H. M., Portillo-Martínez, L. y Viguerras-Guzmán, A. L. 2013. *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) pupal development in the laboratory. *Florida Entomologist* 96: 1424-1433.
- Moore, D. y Prior, C. 1988. Present status of biological control of the coffee Berry borer *Hypotenemus hampei*. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference. *Pests and Diseases (England)* 3: 1119-1123.
- Moreno, M. E. 1987. La problemática y la investigación sobre la conservación de granos. En Memorias del encuentro latinoamericano sobre almacenamiento y conservación de granos básicos. México, D. F.
- Moreno, M. E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Muñoz, J. A., De la Rosa, W. y Toledo, J. 2009. Mortalidad en *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) por diversas cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 25: 609-624.
- Murúa, M. G., Virla, E. G. y Defagó, V. 2003. Evaluación de cuatro dietas para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 29: 43-51.
- Nelson, S. 2005. *Rhizopus* rot of jackfruit. *Plant Disease* 29: 1-2.
- Northover, J. y Zhou, T. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 144-153.
- Nussenbaum, A. L. 2014. Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodnero *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis

de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencia Exactas y Naturales.

- Ocampo, H. J. A., Tamez, G. P., Pineda, S., Tamayo, M. F., Guzmán, F. A., de la Rosa, J. y Martínez, A. 2011. Susceptibility of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Journal of Pest Science* 84: 471-477.
- Ouye, M. T. 1962. Effects of antimicrobial agents on microorganisms and pink bollworm development. *Journal of Economic Entomology* 55: 854-857.
- Pitt, J. I. 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 32: 17-32.
- Pitt, J. I. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC.
- Posada, F. y Vega, F. 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycology* 97: 1195-1200.
- Quattlebawm, C. E. y Carner, G. R. 1980. A new fungal pathogen of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 35: 320-322.
- Richardson, M. D. y Warnock, D. W. 2003. Fungal Infection- Diagnosis and Management. 3<sup>rd</sup> Ed. Blackwell publishing. Oxford, U.K.
- Rodríguez del Valle, N., Rosario, N. y Torres, B. 1983. Effects of pH, temperatura, aeration and carbon source on the development of the mycelial or yeast forms of *Sporothrix schenckii* from conidia. *Mycopathologia* 82: 83-88.
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza, G., Bandani, A. R. y Butt, T. M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 270: 116-123.
- Samson, R. A. y Pitt, J. I. 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers. London.

- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. y Frisvad, J. C. 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi. 7<sup>th</sup> Ed. Central albureau voor Schimmelcultures. Utrecht, Netherlands.
- Sánchez, R. D., Huerta, P. G., Valle, J., Gómez, J. y Toledo, J. 2012. Effect of *Beauveria bassiana* on the ovarian development and reproductive potential of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology* 22: 1075-1091.
- Shapiro, M. 1984. Microorganisms as contaminants and pathogens in insect rearing, pp. 130-142. En E. G. King y N. C. Leppla (eds.), Advances and Challenges in insect rearing. USDA. Washington, D. C.
- Sikorowski, P. P. y Thomson, A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 77: 283-285.
- Sikorowski, P. P., Powell, J. E. y Lawrence, A. M. 1992. Effects of bacterial contamination on development of *Microplitis croceipes* (Himenoptera: Braconidae). *Entomophaga* 37: 475-481.
- Sikorowski, R. y Lawrence, A. 1994. Microbial contamination and insect rearing. *American Entomologist* 40: 240-253.
- Sikorowski, P. P., Inglis, G. D. y Lawrence, A. M. 2001. Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *American Entomologist* 47: 51-60.
- Silva, M. G. 1983. Flora fúngica do ar e do piso no hospital das clinicas da UFMG, Belo Horizonte, Brasil. *Review of Microbiology* 14: 215-222.
- Singh, P. y House, H. L. 1970. Antimicrobials: "safe" levels in a synthetic diet of an insect *Agria affinis*. *Journal of Insect Physiology* 16: 1769-1782.
- Solís, S. A., García, G. C., González, M. M. B., Medrano, R. H. y Galán, W. L. J. 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill.) sobre palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Folia Entomológica Mexicana* 45: 195-200.
- Strett, D. A., Ni, X. y Lawrence, M. A. 2008. Effect of DNA gyrase inhibitors in the diet on biological fitness of the western tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). *Journal of Entomological Science* 43: 86-94.

- Szanişzlo, P. J. 1985. An introduction to dimorphism among zoopathogenic fungi, pp. 3-13. *En* P. J. Szanişzlo y J. I. Harris (eds.), Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans. Plenum Press. New York.
- Tequida, M. M., Cortez, R. M., Rosas, B. E. C., López, S. S. y Corrales, M. C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 84-88.
- Tijerina, G. M. 1997. Implementación de un sistema de cría masiva “in vitro” de los ectoparasitoides de *Anthonomus grandis* y *Anthonomus eugenii*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L., México.
- Trinci, A. P. J., Lane, B. S. y Humphreys, A. M. 1999. Optimization of cultural conditions for the production and longevity of entomopathogenic fungi, *En* Proceedings and abstracts, V<sup>th</sup> International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia.
- Trivedy, K., Nirmal, K. S., Vinutha, N. y Qadri, S. M. H. 2011. *In vitro* testing of common disinfectants used in sericulture to control the growth of fungi in rearing houses. *Research Journal of Microbiology* 6: 439-465.
- Velázquez del Valle, M. G., Bautista, B. S., Hernández, L. A. N., Guerra, S. M. G. y Amora, L. E. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex. Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 49-55.
- Zambrano, G. J. 2013. Antimicrobiales para el control de hongos en una dieta artificial y su importancia en la supervivencia y reproducción de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.