

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POST-GRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Identificación molecular de la diversidad bacteriana intestinal
de *Hermetia illucens* (Stratiomyidae-Diptera) mediante
técnicas independientes, dependientes y espectrometría de
masas Maldi tof/tof**

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Autor, Jimena Lizbeth Casariego Oblea

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POST-GRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Identificación molecular de la diversidad bacteriana intestinal
de *Hermetia illucens* (Stratiomyidae-Diptera) mediante
técnicas independientes, dependientes y espectrometría de
masas Maldi tof/tof**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Deza Navarrete Carlos Alberto (Presidente) _____

Mg. Valladolid Ramos Milton (Secretario) _____

Ph. D. Cedeño Escobar Virna Alexia (Vocal) _____

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Identificación molecular de la diversidad bacteriana intestinal
de *Hermetia illucens* (Stratiomyidae-Diptera) mediante
técnicas independientes, dependientes y espectrometría de
masas Maldi tof/tof**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido
y forma:**

Br. Jimena Lizbeth Casariego Oblea (Autor)

Ph. D. D. E. Eric Louis Mialhe Matonnier (Asesor)

Mg. Luis Dicson Sánchez Abad (Co-Asesor)

Tumbes, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

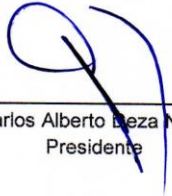
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintisiete días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 12.00 horas, en EL AULA N° 01 DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 054-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Mg. Milton Valladolid Ramos - Secretario; Ph.D. Virna Alexia Cedeño Escobar - Vocal y con Resolución Directoral N° 045-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: **Identificación Molecular de la diversidad bacteriana intestinal de *Hermetia illucens* (Stratiomyidae-Diptera) mediante técnicas independientes, dependientes y espectrometría de masas Maldi tof/tof**, presentada por la estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Jimena Lizbeth Casariego Oblea, asesorada por el Ph.D. Eric Louis Mialhe Matonnier y coasesorada por el M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad.

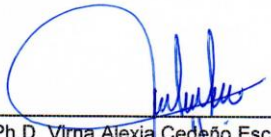
Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: **SOBRESALIENTE**, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12.40 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 27 de febrero de 2020.


Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente


Mg. Milton Valladolid Ramos
Secretario


Ph.D. Virna Alexia Cedeño Escobar
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo siempre, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres Manuel Casariego y Clara luz Oblea, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento.

También dedico esta investigación a mi esposo Steward Huamán y a mi hijo Aziel, a mi esposo por la confianza y apoyo en cada reto que se me presentaba, a mi hijo porque en mi vientre fue participe en la fase final de la investigación. Los amo con mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios, porque Él es quien da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.

A Eric Louis Mialhe Matonnier, por su guía y colaboración para hacer posible la presente Tesis

A nuestros compañeros del equipo de INSECT BIOTEC por su disposición y colaboración.

A mi familia por la paciencia y el tiempo que esperaron mientras lo invertía en mi preparación.

A todos los docentes y personal técnico de la empresa INCABIOTEC SAC que nos brindaron su apoyo, confianza y conocimiento.

INDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCION	14
II. REVISION DE LITERATURA	17
III. MATERIALES Y METODOS	20
3.1 Crianza de <i>Hermetia illucens</i>	20
3.2 Muestreo	20
3.3 Desinfección externa de larvas	21
3.4 Extracción del ADN metagenómico de bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	21
3.5 Aislamiento e identificación molecular de bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i>	22
3.5.1 Aislamiento de bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i>	22
3.5.2 Extracción del ADN genómico de bacterias aisladas	23
3.5.3 Amplificación del ADNr 16S mediante PCR “Reacción en cadena de la polimerasa”	24
3.5.4 Electroforesis	24
3.5.5 Secuenciación de amplicones	25
3.5.6 Análisis bioinformático	25
3.6 Extracción de proteínas de las bacterias aisladas del tracto digestivo de <i>Hermetia illucens</i>	25
3.7 Separación y digestión de proteínas bacterianas en electroforesis en gel 1D SDS-PAGE	26
3.8 Análisis bioinformático de proteínas bacterianas mediante espectrometría de masas maldi tof/tof	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Diversidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i> mediante técnicas independientes de medio de cultivo “Metagenómica”	29

4.2	Diversidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i> mediante técnicas dependientes de medio de cultivo	31
4.3	Identificación de bacterias aisladas del tracto digestivo de <i>Hermetia illucens</i> usando la espectrometría de masas maldi tof/tof	33
V.	CONCLUSIONES	36
VI.	RECOMENDACIONES	37
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
VIII.	ANEXOS	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Identificación de especies bacterianas del intestino de larvas de <i>H. illucens</i> con ROD, utilizando un enfoque independiente del cultivo con el gen 16S rRNA.	42
Cuadro 2. Identificación de especies bacterianas del intestino de larvas de <i>H. illucens</i> con RHD, utilizando un enfoque independiente del cultivo con el gen 16S ARNr.	43
Cuadro 3. Bacterias aisladas de intestinos de larvas de <i>H. illucens</i> identificadas por análisis de secuencia del gen 16S ARNr.	46
Cuadro 4. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i> RO, identificadas mediante MALDI TOF/TOF	50
Cuadro 5. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>Hermetia illucens</i> RH, identificadas mediante MALDI TOF/TOF	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H.illucens</i> a nivel de phylum en 2 dietas "ROD" y "RHD"	44
Figura 2. Bacterias del tracto disestivo de larvas de <i>H.illucens</i> a nivel de clase en 2 dietas"ROD" y "RHD"	44
Figura 3. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H.illucens</i> a nivel de Orden en 2 dietas"ROD" y "RHD"	45
Figura 4. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H.illucens</i> a nivel de familia en 2 dietas"ROD" y "RHD"	45
Figura 5. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> a nivel de Genero en 2 dietas"ROD" y "RHD"	46
Figura 6. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> a nivel de clase en 2 dietas "ROC" y "RHC"	47
Figura 7. Porcentaje de la Abundancia de la comunidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> por su abundancia	48
Figura 8. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> a nivel de Genero en 2 dietas "ROC" y "RHC"	49
Figura 9. Abundancia en porcentaje de las secuencias peptídicas según su género en larvas RO	53
Figura 10. Abundancia en porcentaje de las secuencias peptídicas según su género en larvas RH: larvas RH	53
Figura 11. Bacterias del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> a nivel de Género en 2 dietas "ROC" y "RHC" según espectrometría de masas MALDI TOF/TOF	54
Figura 12. Crianza de <i>Hermetia illucens</i> y muestreo	55
Figura 13. Desinfección externa de larvas	55
Figura 14. Aislamiento de la microbiota intestinal de las larvas de <i>H. illucens</i>	55
Figura 15. Amplificación del ADNr 16S mediante PCR "Reacción en cadena de la polimerasa"	55

Figura 16. Extracción del ADN Metagenómico del tracto digestivo de <i>H. illucens</i>	56
Figura 17. Electroforesis	56
Figura 19. Alineamiento de secuencias	56
Figura 20. Extracción de proteínas de la microbiota aislada del tracto digestivo de <i>H. illucens</i>	56
Figura 21. Separación y digestión de proteínas en electroforesis en gel unidimensional	56
Figura 22. Procesamiento de datos en espectrometro de masas “MALDI TOF/ TOF”.	56
Figura 23. Análisis de proteínas de la microbiota intestinal del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> por espectrometría de masas “MALDI TOF/ TOF”	56

RESUMEN

La necesidad de aumentar la sostenibilidad en la agricultura, para garantizar la seguridad alimentaria de las generaciones futuras, está dando lugar a la aparición de instalaciones de cría industrial para insecto. *Hermetia illucens* ha recibido una mayor atención científica por su potencial en el manejo de los residuos, donde las larvas de este insecto pueden servir como alimento para peces, aves y ganado, además de la obtención de biodiesel, su valor científico y comercial de las larvas de *H. illucens* ha aumentado recientemente, por lo que es necesario enfocarse en la masificación de dicho insecto. En este estudio, presentamos una identificación a profundidad de la microbiota intestinal de *H. illucens* usando técnicas independiente, dependientes de medio de cultivo con la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA y la Espectrometría de Masas MALDI TOF/TOF, e informar la presencia de bacterias que ayudan en la degradación y oviposición de *H. illucens*. Ochenta y siete unidades taxonómicas operativas (OTU) se identificaron desde el intestino larvario. Las OTU representaban 5 phyla, 10 clases, 18 órdenes, 27 familias y 50 géneros. La mayoría de las OTU bacterianas pertenecían al Orden Enterobacteriales, que era el taxón más abundante en el intestino larvario. Las bacterias cultivables revelaron once OTU que pertenecían a Gammaproteobacteria. Posteriormente, examinamos a nivel de proteínas mediante la Espectrometría de Masas MALDI TOF/TOF revelaron 61 secuencias peptídicas presentes en tracto digestivo de *H. illucens*, bacterias que ayudan en la degradación y oviposición. Nuestro estudio proporciona la primera identificación de la diversidad microbiana intestinal de las larvas, mediante técnica moleculares direccionada fuertemente a nivel de la metagenómica, genómica y Proteómica, mostrando que algunas bacterias cultivables desempeñan un papel importante para satisfacer las necesidades en la degradación de residuos y la reproducción de *H. illucens*.

Palabras clave: MALDI TOF / TOF, metagenómica, microbiota y *Hermetia illucens*

ABSTRACT

The need to increase sustainability in agriculture, to ensure food security for future generations, is leading to the emergence of industrial breeding facilities for insects. *Hermetia illucens* has received greater scientific attention for its potential in waste management, where the larvae of this insect can serve as food for fish, birds and livestock, in addition to obtaining biodiesel, its scientific and commercial value of *H. illucens* larvae has recently increased, so it is necessary to focus on the massification of said insect. In this study we presented as in depth identification of the gut microbiota using independent techniques, dependent on culture medium with high performance sequencing of the 16S rRNA gene and MALDI TOF / TOF mass spectrometry, and reporting the presence of bacteria that aid in the degradation and oviposition of *H. illucens*. Eighty seven operational taxonomic units (OTU) were identified from the larval intestine. The OTU represented 5 phyla, 10 classes, 18 orders, 27 families and 50 genres. Most of the bacterial OCTs belonged to the Enterobacterial order, which was the most abundant taxon in the larval gut. Cultivable bacteria revealed eleven OTUs that belonged to Gammaproteobacteria. Subsequently, we examined at the protein level using MALDI TOF / TOF mass spectrometry revealed 61 peptide sequences present in the digestive tract of *H. illucens*, bacteria that aid in the degradation of waste and oviposition of *H. illucens*. Our study provides the first identification of the intestinal microbial diversity of *H. illucens* larvae, using molecular technique strongly addressed at the level of metagenomics, genomics, and proteomics, showing that some cultivable bacteria play an important role in meeting needs in the degradation of residues and reproduction of *H. illucens*.

Key words: MALDI TOF / TOF, metagenomics, microbiota and *Hermetia illucens*

I. INTRODUCCIÓN

La mosca soldado negro “BSF” por sus siglas en inglés, cuyo nombre científico es *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae) es un insecto endémico de las zonas tropicales, subtropicales y templadas cálidas de América (Hoc, B et al. 2019), es capaz de convertir eficientemente una amplia variedad de materiales orgánicos, desde desechos de alimentos hasta estiércol, en biomasa de insectos para la alimentación del ganado y la acuicultura; además se encuentra entre los insectos de granja más importantes del mundo (Vogel et al., 2018), convirtiéndose gradualmente en una biotecnología prometedora para el manejo de desechos. (Jiang et al., 2019).

Hermetia illucens es una especie saprófaga cuya dieta es polífaga y la calidad de los macronutrientes (principalmente lípidos y proteínas) de estas larvas los convierten en excelentes candidatos para diversas aplicaciones, como manejo de desechos y materiales orgánicos, incorporación en alimentos para animales o fuentes de energía alternativas. El desarrollo de la crianza masiva en las condiciones templadas o de bajas temperaturas requiere procesos artificiales para producir huevos y larvas de alta calidad (Hoc et al., 2019); sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre los procesos de degradación, apareamiento y oviposición, pasando por alto una comprensión profunda de las propiedades morfofuncionales del intestino larval, cuyo órgano es clave ya que determina la extraordinaria plasticidad dietética de este insecto (Bonelli et al., 2019).

Los insectos son colonizados por diversos microorganismos, facilitando una amplia gama de procesos fisiológicos y desempeñando un papel crucial en la nutrición, apareamiento, interacciones ecológicas y sociales para sus huéspedes, (Pinto et al., 2009).

Las interacciones entre microbios y organismos multicelulares a menudo son difíciles de caracterizar (Janzen *et al.*, 1977). Se ha demostrado que los microbios intestinales son muy importantes para el comportamiento y el desarrollo del insecto, ya que los microbios beneficiosos participan en la degradación y la identificación de lugares adecuados para la alimentación y la puesta de huevos (Archie y Tung, 2015).

Como se sabe las larvas de *Hermetia illucens* (mosca negra del soldado) pueden reducir el desperdicio de alimentos, el valor científico y comercial de las larvas de *H. illucens* ha aumentado recientemente. La próxima década promete ser extremadamente interesante para este campo de investigación y verá el surgimiento de la optimización microbiológica de *H. illucens* como un insecto sostenible para la cría industrial y la explotación de su microbioma para nuevas aplicaciones biotecnológicas (De Smet *et al.*, 2018). Nuestra hipótesis es que la capacidad de degradación catabólica por las larvas y la puesta de huevos podrían deberse a microorganismos intestinales. Por lo tanto, nuestro estudio proporciona una mejor comprensión de cómo los microbios intestinales que influyen en el comportamiento y el desarrollo de los insectos, y ofrece una justificación ecológica de las preferencias de las moscas para diferentes microbios en su entorno natural (Qiao *et al.*, 2019).

Las moscas transportan bacterias específicas con sus larvas que proporcionan una gama más amplia de nutrientes para esas bacterias. La interacción simbiótica entre bacteria-insecto puede depender de la señalización del interkingdom (Ma *et al.*, 2012).

La búsqueda de métodos que aumenten la exactitud y disminuyan los tiempos de respuesta en la identificación bacteriana ha venido ganando terreno es la biología molecular, siendo bastante precisa, así como la identificación bacteriana basada en

la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF, por su sigla en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*, la cual es una técnica existente hace más de 30 años (Garcia *et al.*, 2012).

Dados sus roles biológicos universales y altamente conservados, consideramos que *Hermetia illucens* presenta bacterias asociadas que estimula la degradación y ovoposición de desechos. El propósito de este estudio fue identificar las comunidades microbianas intestinales que median la oviposición de bacterias cultivables de larvas de *H. illucens* del cuarto estadio. La identificación de las comunidades microbianas la cual se basó en enfoques o técnicas independientes, dependientes medio de cultivo y espectrometría de masas MALDI-TOF.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El primer informe del análisis de una comunidad bacteriana en larvas de *H. illucens* se publicó en el año 2011 y tenía como objetivo caracterizar a la comunidad microbiana intestinal con notables habilidades catabólicas de estas larvas durante la cría en laboratorio de tres sustratos diferentes (desperdicio de alimentos, forraje para terneros y arroz cocido) (Jeon *et al.*, 2011).

Se sabe que las bacterias asociadas con la etapa del huevo mosca *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) son esenciales para que los adultos detecten y midan los sitios de oviposición (Lam *et al.* 2007). Si no se ponen los huevos dentro de un período de tiempo dado, las larvas mueren debido a la falta de recursos o al canibalismo por las larvas más viejas ya presentes (Lam *et al.*, 2007).

Las moscas gravid, *Musa domestica* L. (Diptera: Musasidae) utilizan la detección multisensorial para evaluar compuestos volátiles producidos por microbios específicos asociados a un recurso de ovoposición depositados en desechos en descomposición y así asegurar el desarrollo larvario sincrónico que permite una alimentación agregada y menor probabilidad de canibalismo (Lam *et al* 2007). Las bacterias asociadas a los huevos también proporcionan recursos alimentarios iniciales y protección contra hongos patógenos en la carroña (Lam *et al.*, 2009).

En el sistema olfativo, hay dos receptores ionotrópicos (IR) co expresados, IR76b e IR41a, median la atracción de largo alcance hacia el olor. En el sistema gustativo, se utiliza la sensación de sabor multimodal por el receptor IR76b y las neuronas del receptor amargo GR66a para evaluar la calidad y la valencia de los compuestos volátiles, lo que proporciona un mecanismo para la alta atracción de la mosca por desechos en descomposición (Hussain *et al.*, 2016).

Drosophila melanogaster exhibe diferentes preferencias de comportamiento hacia los microbios; Tanto los adultos como las larvas son atraídos por los compuestos volátiles de bacterias, la exposición de larvas de *Drosophila* a microbios promovió su desarrollo, resultando en el desarrollo de ovarios siendo estos más grandes y un mayor número de huevos en un ensayo de oviposición (Wong *et al.*, 2017).

Los métodos independientes de cultivo son esenciales para comprender la diversidad genética, la estructura de la población y los roles ecológicos de la mayoría de los microorganismos. La metagenómica, o el análisis genómico independiente del cultivo de un conjunto de microorganismos, tienen el potencial de responder preguntas fundamentales en la ecología microbiana. En muchos entornos, hasta el 99% de los microorganismos no se pueden cultivar mediante técnicas estándar, y la fracción no cultivada incluye diversos organismos que solo están distantemente relacionados con los cultivados. Riesenfeld, Schlossy Handelsman (2004).

Mediante el empleo de técnicas moleculares basadas en la amplificación por PCR de genes de ARNr de 16S y secuenciación, así como mediante el análisis metagenómico utilizando herramientas bioinformáticas. De esta manera, se puede obtener una gran diversidad de especies bacterianas asociadas a múltiples funciones metabólicas y algunas de las cuales tienen posibles aplicaciones en tareas de biorremediación (Pérez *et al.*, 2012).

La diversidad filogenética de la microflora intestinal de una termita, *Reticulitermes speratus*, examinada mediante una estrategia que no se basa en el cultivo de los microorganismos residentes. Las bacterias que se encuentran en el intestino de las termitas pertenecían a estaban filogenéticamente afiliados a cuatro de los grupos principales del dominio Bacteria: la Proteobacteria, el grupo de espiroquetas, el grupo Bacteroides. Dentro de las proteobacterias, los clones de ADNr 16S mostraron una estrecha relación con los de las especies cultivadas de bacterias entéricas y bacterias reductoras de sulfato, mientras que los clones de ADNr 16S

en los tres grupos restantes mostraron solo relaciones distantes con las de los organismos conocidos en estos grupos. (Ohkuma y Kudo, 1996).

Una brecha de conocimiento se refiere al impacto de la comunidad microbiana asociada con *H. illucens* en el rendimiento y la salud de este insecto, los primeros pasos en la caracterización de la microbiota en *H. illucens* y el análisis de la dinámica dependiente del sustrato en su composición, las interacciones entre microorganismos y el insecto durante el desarrollo de *H. illucens*, esto presta atención a cómo la investigación del microbioma puede conducir a estrategias de valorización alternativas para *H. illucens*, como (i) la manipulación de la microbiota para optimizar la producción de biomasa de insectos y (ii) la explotación de la interacción de microbiota - *H. illucens* para el descubrimiento de nuevas enzimas y nuevas estrategias antimicrobianas basadas en inmunidad utilizando el organismo completo o sus moléculas. (De Smet *et al.*, 2018).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Crianza de *Hermetia illucens*

Las larvas de *H. illucens* fueron criarán a escala de laboratorio con dos tipos de residuos: Residuos orgánicos “RO” y Residuos hidrobiológicos “RH”. Los residuos de orgánicos se homogenizarán utilizando licuadora casera (Osterizer-BLENDER) y se almaceno a - 20 ° C. Los residuos Hidrobiológico se obtuvieron de una Empacadora langostera (Marinasol). Al llegar al laboratorio, estos se trituraron y la suspensión se almaceno a - 20 ° C. No se realizó tratamientos a los sustratos. Los sustratos congelados se descongelaron durante 3 días a 4 ° C, y todos los sustratos se colocaron a temperatura ambiente durante 4 horas antes de administrar a las larvas. Al comienzo de cada ciclo de crianza se colocaron los huevos de *H. illucens* en un vaso de plástico (200 ml) con 15 g de sustrato respectivo y se incubo a 30 ° C. 5 días después de la eclosión larval, se colocaron en un vaso de plástico más grande de (0.55 x 0.35 x 0.16 m), que contenia 150 g de alimento. Se mantuvieron con un contenido de humedad de aproximadamente 70 % el cual mantuvo el crecimiento larvario adecuado y al mismo tiempo un secado eficiente.

Las larvas se recolectaron, retirándolas manualmente del residuo con unas pinzas estériles, en el día 17 (estado larval L4).

3.2. Muestreo

Las muestras de las larvas de *H. illucens* se tomaron de los dos sustratos, en la etapa larval L4. Después del muestreo, las larvas se lavaron con agua

de caño en un tamiz (tamaño de malla de 1 mm) por 1 minuto, eliminando los residuos restantes de la superficie de las larvas. Todas las muestras se almacenaron, a 4° C.

3.3. Desinfección externa de larvas

Las muestras de larvas se sometieron a una desinfección externa, el cual consistió en sumergir las larvas en soluciones de hipoclorito de sodio 0.5 % y formalina 10 %. Posteriormente se realizará 3 lavados en cloruro de sodio al 0.15 M.

El agua del tercer lavado, se colocó en agar tripticasa de soya (TSA) por 24 horas, como control de protocolo de desinfección externa de las larvas.

3.4. Extracción del ADN metagenómico de bacterias del tracto digestivo de *Hermetia illucens*

Las muestras pre tratadas se diseccionaron y se extrajo el tracto digestivo, el ADN metagenómico se obtuvo con el kit “**PowerSoil® DNA Isolation Kit**” y se secuenciaron mediante el servicio del proveedor MR. DNA (Shallowater, TX 79363 USA) y se analizó con programas bioinformáticos.

El Protocolo de extracción de ADN metagenómico consistió en:

- a. Mezclar 0.18 gr de la muestra con 1ml del Buffer de extracción ADN y agregar 7.4µl de Proteinasa K (10 mg/ml).
- b. Incubar a 37°C por 30 minutos en agitación a 225 rpm. (shaking).
- c. Agregar 110µl de SDS al 20% y luego incubar a 65°C por 2 horas.
- d. NOTA: Mezclar los tubos cada 15-20 minutos en el periodo de incubación.
- e. Centrifugar los tubos a 6000xg por 10 minutos a temperatura ambiente.

- f. Transferir el sobrenadante a nuevos tubos (sobrenadante 01) y el pellet de estos se le agrega 400µl del BUFFER DE EXTRACCION DNA y 50µl de SDS al 20%.
- g. Vortexear las muestras e incubar a 65°C por 10 minutos.
- h. Centrifugar los tubos a 6000xg por 10 minutos a temperatura ambiente.
- i. Recuperar el sobrenadante y unirlo con el sobrenadante 01 que se recuperó en el paso 5.
- j. Agregar un volumen igual de cloroformo isoamilico (24:1).
- k. Centrifugar los tubos a 6000xg por 10 minutos a temperatura ambiente.
- l. Recuperar el sobrenadante y agregar 0.6 volumen de isopropanol e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- m. Centrifugar a 16 000xg por 20 minutos a temperatura ambiente.
- n. Eliminar el sobrenadante y agregar 500µl de etanol al 70%.
- o. Centrifugar los tubos a 6000xg por 10 minutos a temperatura ambiente.
- p. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet.
- q. Resuspender en 40µl de agua desionizada.

3.5. Aislamiento e identificación molecular de bacterias del tracto digestivo de las larvas de *Hermetia illucens*

3.5.1. Aislamiento de bacterias del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens*

El Aislamiento de la microbiota intestinal de las larvas de *H. illucens* se realizó suspendiendo el tracto digestivo en el medio TSB (Tryptic Soy Broth) e incubo a 30 °C por 48 horas, y mediante el método de diluciones seriadas(1/1000), colocando volúmenes de 100 µl en cada placa con TSA, estas son incubadas a 30°C por 24 horas. Posterior a esto, se seleccionaron y purificaron las cepas con morfología diferente.

3.5.2. Extracción del ADN genómico de bacterias aisladas

Los aislados bacterianos se sub cultivaron en medio TSB e incubaron a 30 ° C durante 48 horas.

El ADN de los aislados bacterianos se obtuvieron utilizando el protocolo de extracción de ADN bacteriano CTAB 2X, el cual consistió en:

- a. Centrifugar los tubos que contienen el cultivo bacteriano a 12,000 rpm por 5 min.
- b. Descartar el sobrenadante.
- c. Agregar 695 µL del BUFER CTAB 2X que contiene 2 % CTAB, 100 Mm Tris-HCl (PH 8), 20 Mm EDTA, 1.4 Mm NaCl, 0.2 % β Mercaptoetanol y 0.1mg/ml proteinasa K (0.1 mg/ml).
- d. Incubar a 60°C por 1 hora.
- e. Mezclar invirtiendo el micro tubo de vez en cuando
- f. Agregar 700 ul de cloroformo-isoamillico (24:1)
- g. Mesclar por inversión suavenmente por 2 minutos.
- h. Centrifugar por 10 minutos a 14000 x g a 4°C.
- i. Recuperar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
- j. Agregar Isopropanol (2/3 del volumen recuperado).
- k. Mezclar por inversión los tubos suavemente e incubar a -20°C por 2 horas.
- l. Centrifugar por 15 min a 14000 x g a 4°C.
- m. Descartar el sobrenadante y agregar 400 µL de Etanol al 75%.
- n. Centrifugar por 10 min a 14000 x g a 4°C.
- o. Descartar el sobrenadante y secar el pellet.
- p. Resuspender el pellet en 30 ul de T.E pH 8.0 (10 Mm Tris-HCl- 1 mM EDTA).
- q. Agregar 1ul de Rnase (10mg/ml) e incubar por 30 minutos a 37°C.
- r. Almacenar a -20°C.

3.5.3. Amplificación del ADNr 16s mediante PCR “reacción en cadena de la polimerasa”

La amplificación de los fragmentos de los genes 16S rRNA de cada aislados bacteriano, se realizó por separado usando los cebadores 27F Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492 R Reverse.

El MIX de reacción de PCR se realizó con volumen final de 25 µl el cual contenía: 2 µl de ADN, 5µl del Buffer Taq 10 X (Thermo Scientific); 0.2 µl de Taq DNA polymerase Recombinante 5U/ µl (Thermo Scientific); 2.5 µl de Mg Cl₂ (25 mM) ((Thermo Scientific); 0.5 µl de DNTP´s (10 mM) (Promega); 0,6 µl de primers (27F y 1492R) a 15 pmol/u y agua ultra pura 18.6 µl.

El programa de PCR tuvo como etapa de desnaturalización inicial 95 ° C por 60 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C por 30 segundos, hibridación de los cebadores a 58 ° C por 30 segundos y extensión de los cebadores a 72 ° C por 60 segundos con una extensión final de 72 ° C por 6 minutos.

3.5.4. Electroforesis

Después de la reacción en cadena de la polimerasa, los fragmentos amplificados se separaron mediante la técnica de electroforesis en gel acrilamida 1.5 %, TAE 1 X “Tris-acetato-EDTA” como diluyente, bromuro de etidio (0.5 ug/ml).

Los fragmentos amplificados se depositaron en los posillos del gel con 2 ul de azul de bromofenol como tampón de carga y 8 ul del producto de PCR, se migraron por 25 minutos a 90 ° C.

3.5.5. Secuenciación de amplicones

Los productos amplificados de PCR que mostraron bandas del tamaño esperado, bien definidas y sin smir, se enviarán a un proveedor de servicios, para la secuenciación de fragmento del ADN "MACROGEN". Los resultados de secuenciación fueron procesados mediante programas bioinformáticos.

3.5.6. Análisis Bioinformático

El Análisis bioinformático consistió inicialmente con el alineamiento de cada secuencia. Se realizó mediante MEGA7 un software de análisis de secuencias, alineando las secuencias hasta encontrar la región conservada.

Después de obtener las secuencias completas, se compraron en la base de datos del Gen Bank, mediante las herramientas de búsqueda de alineamiento local básica nucleotídica (BLASTn).

3.6. Extracción de proteínas de las bacterias aisladas del tracto digestivo de *Hermetia illucens*

Las larvas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5 % y formalina 10al % y se lavaron tres veces con cloruro de sodio al 0.15 M y agua destilada estéril Las muestras pre tratadas se diseccionaron y se extrajo el

tracto digestivo y se procedió a la extracción de proteínas agregando 100 µl de buffer de extracción (8 M de urea, 20 mM de 1,4-Dithiothreitol (DTT), 100 mM de Tris, 0,75 mM de Fluoruro de Fenil metanosulfonilo (PMSF) y 4% de 3-[(3-Colamidopropil) dimethylammonio]-1-propanosulfonato hidratado (CHAPS) a pH = 8, subsecuentemente se procedió a sonicar por 10 min. y luego se incubó en hielo por 30 min., homogenizando ligeramente cada 15 min y se centrifugó a 10 000 G durante 15 min. a 4 °C.

3.7. Separación y digestión de proteínas bacterianas en electroforesis 1D SDS-PAGE

Se procedió a la preparación del gel, siguiendo el protocolo de Leammli (1970), con ligeras modificaciones. Por lo consiguiente el gel de separación al 12 % se formó adicionando las siguientes soluciones: (volumen total = 5 ml), 1,7 ml de agua bidestilada, 2 ml de acrilamida al 30 %, 1,3 ml de 1.5 M tris a pH 8.8 y 0.05 ml de 10 % Sulfato Dodecil Sódico (SDS), 0.05 ml de 10 % Persulfato de Amonio (APS), 0.002 ml de Tetrametiletilendiamina (TEMED).

Se homogenizó y se transfirió rápidamente a la cámara de fundición entre las placas de vidrio, seguido del adicionamiento de una pequeña capa de isopropanol en la parte superior, antes de la polimerización para alinear el nivel del gel. Una vez que el gel se polimerizo, se retiró el isopropanol, para preparar el gel de alineamiento con las siguientes soluciones: (3 ml de volumen total), 1.4 ml de agua bidestilada, 0.33 ml de acrilamida al 30 %, 0.25 ml de 1M tris a pH 6.8, 0.02 ml SDS 10 %, 0.02 ml de APS 10 %, 0.002 ml de TEMED.

De la misma manera se homogenizó y se transfirió rápidamente hasta que el espacio este lleno y luego se insertó la peineta, hasta que el gel solidificó, para posteriormente retirar la peineta. Después se depositaron 30 µl de

proteínas, mezclado con 20 µl de buffer de corrida, para posteriormente incubar en baño seco a 95 °C por 10 min. Se enfrió y se depositó en pozos del gel, sometiénolas a un campo eléctrico de 90 V, 50 A durante 3 h.

En la digestión de proteínas se realizó modificando ligeramente el protocolo de (Sebastina *et al.*, 2013), cortando las bandas presentes con una hoja de bisturí estéril y se depositaron en microtubos eppendorf de 0.2 ml de forma individual, adicionándoles 100 µl de bicarbonato de amonio a 100 mM más acetonitrilo a un volumen 1:1, la mezcla se incubó con agitación ocasional por 30 min, transcurrido el tiempo se eliminó la solución y se adiciono 100 µl de acetonitrilo al 100 %. El contenido se incubó a temperatura ambiente hasta que las piezas de gel se tornen blancas y luego se removió el acetonitrilo.

Posteriormente se agregó buffer tripsina a 13 ng/µl hasta cubrir las piezas del gel (25 µl aprox.), almacenándolo a 4 °C durante 2 h y luego se incubaron a 37 °C por 4 horas. Después se adicionó 50 µl de buffer de extracción (5% ácido fórmico/ acetonitrilo a una proporción 1:2 en volumen) y se incubaron a 37 °C por 15 min con agitación ocasional.

Se centrifugo a 800 RPM por 1 min. Se separó una alícuota de 10 µl y se sonicó por 5 min. Para ser secadas en bomba al vacío.

Posteriormente, se agregó 2 µl de TFA al 0.1% en Agua grado HPLC y 2 µl de matriz CHCA 10 mg/ml (α -cyano-4-hidroxicinámico acid), después se homogeneizó y se depositó 1 µl de la muestra en la placa Opti ToF, para ser analizadas por el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF.

3.8. Análisis bioinformático de proteínas bacterianas mediante espectrometría de masas “maldi tof/ tof”

El análisis de proteínas se obtuvo a partir de un sistema analizador proteómico MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System), Los espectros fueron captados en modo MS, reflector positivo con un láser Nd: YAG de 349 nm con una intensidad de 3800 unidades de láser y una velocidad de 600µm/segundo, 600 disparos dentro de un rango de masas entre 800-4000 m/z y procesados en el software proteinPilot™; para la calibración del equipo se utilizó un kit Mass Standards AB SCIEX TOF/TOFTM Instruments. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa bioinformático Protein BLAST.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diversidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* mediante técnicas independientes de medio de cultivo “Metagenómica”

La microbiota intestinal del insecto *H. illucens* se extrajo de los intestinos del estadio larvario L4 de dos dietas: Residuos orgánicos “ROD” y residuos hidrobiológicos “RHD”. La secuenciación de alto rendimiento de los ADN bacterianos de la microbiota intestinal dio como resultado un total de 66 674 y 16166 lecturas sin procesar para ROD y RHD respectivamente. La longitud promedio de la secuencia del amplicón fue de 1500 pb aproximadamente.

El número total de unidades taxonómicas operativas (OTU) asignadas durante el análisis fue de 87 y 42 OTU bacterianas para para ROD y RHD respectivamente (Cuadro 1 y 2). El análisis reveló que la mayoría de las OTU se distribuyeron en cinco filos, de los cuales 2 filos fueron comunes en "ROD" y "RHD": proteobacterias firmicutes (Figura. 1). Diez clases, de las cuales 3 fueron comunes en "ROD" y "RHD": gammaproteobacteria, bacilos y clostridia (Figura. 2). Dieciocho órdenes, de los cuales 6 fueron comunes en "ROD" y "RHD": alteromonadales, bacillales, clostridiales, enterobacteriales, lactobacillales y pseudomonadales (Figura. 3). Veintisiete familias, de las cuales 9 fueron comunes en "ROD" y "RHD": bacillaceae, Carnobacteriaceae, Clostridiaceae, enterobacteriaceae, enterococcaceae, paenibacillaceae, pseudoalteromonadaceae, pseudomonadaceae y Streptococcaceae; (Figura. 4). Cincuenta géneros de los cuales 26 géneros fueron comunes en "ROD" y "RHD": Klebsiella, ignatzschineria, Proteus, enterobacter, pantoea, citrobacter,

pseudomonas, cosenzaea, enterococo, raoultella, providencia, lactococcus, salmonella, candidatus, nardonella, lelliottia, erwinia, cedecea, kluyvera, serratia, granulicatella, clostridium, morganella, acinetobacter, bacillus, marinobacter y vibrio; (Figura. 5).

El predominio de las comunidades bacterianas entre los grupos de larvas de *H. illucens* alimentadas con diferentes dietas mostró que el tipo de alimento influía directamente en la diversidad bacteriana. Se reveló que estas comunidades bacterianas son bastante únicas en comparación con la de la microflora intestinal de otros insectos, como ejemplo, el análisis de la microflora en el intestino de las termitas ha sido bien estudiado como un sistema modelo para la coevolución de microbios intestinales con diferentes géneros de termitas para la coevolución de microbios intestinales con diferentes géneros de termitas (Breznak y Brune, 1994).

Un estudio realizado en el año 2011 utilizando otros cebadores: SSU-F (27f) y SSU-R (518r). en larvas de *H. illucens* alimentadas con tres dietas diferentes indicaron que comprendían de 36 cepas bacterianas, aquellas larvas que fueron alimentadas con muestras de residuos alimenticios presentaron comunidades bacterianas cuyos filamentos consistieron en Bacteroidetes (67.36%), Proteobacterias (18.85%), Firmicutes (9.4%), Fusobacterias (2.01%) y Actinobacterias (1.92%); los filamentos encontrados en el intestino de las muestras alimentadas con arroz cocido fueron Proteobacterias (54.01%), Firmicutes (42.27%) y bacterias no clasificadas (3.52%), y las larvas alimentadas con forraje consistieron en proporciones iguales de cuatro filos: Proteobacterias (31.08%), Actinobacterias (24.58%), Firmicutes (23.46%) y Bacteroidetes (20.51%), amplificados por los (Jeon *et al.*, 2011).

4.2. Diversidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* mediante técnicas dependiente de medio de cultivo.

Se estudiaron un total de 75 colonias bacterianas seleccionadas de las larvas de *H. illucens*. La selección de una colonia se basó aleatoriamente en el morfotipo de las colonias. Se extrajo ADN individual de cada colonia, y la secuenciación de ADN del gen 16S rRNA se realizó mediante métodos de secuenciación Next Generation Sequencing (NGS). El análisis de secuencia del gen 16S rRNA mostró 11 OTU, identificadas como varias especies de *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Ignatzschineria*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* y *Vagococcus*, cuyos detalles se muestran en la Cuadro 3.

La identificación de secuencias mediante búsquedas BLAST de bacterias cultivables reveló que entre los 75 aislamientos, la mayoría de las OTU se distribuyeron en dos filos: proteobacteria y Firmicutes de los cuales ambos fueron comunes en "ROC" y "RHC"; dos clases: Gammaproteobacteria y Bacilli fueron comunes en "ROC" y "RHC" (Figura. 6); cuatro órdenes: Enterobacteriales, Pseudomonadales, Lactobacillales y Bacillales ; el género más abundante en ROC fue *Providencia* (28 %), *proteus* y *Klebsiella* presentando 22 % y 19 % de las bacterias cultivables respectivamente, mientras que en RHC el género más abundante fue *Morganella* (23 %), *Ignatzschineria* y *Proteus* con 21 % y 15 % de las bacterias cultivables respectivamente (Figura. 7). seis géneros de los microorganismos cultivables fueron comunes en "ROC" y "RHC" con 66.7 %, siendo estos: *Providencia*, *Proteus*, enterococo, *acinetobacter*, *Bacilo* y *morganella* (Figura. 8).

Los microbiomas bacterianos de especies de insectos proporcionan una comprensión básica de la diversidad de su comunidad y la influencia potencial en la ecología y evolución del huésped.

Estudios realizados en el año 2013 informa sobre la diversidad bacteriana en cada etapa del desarrollo y demuestra que la composición de las especies bacterianas cambia dentro del ciclo de vida. La diversidad bacteriana de la mosca soldado negro a nivel de phylum fue similar entre las diferentes etapas de la vida; sin embargo, la diversidad a nivel de género fue mayor durante las etapas prepupal, pupal y adulta que en la etapa del huevo. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta que los huevos de la mosca soldado negro son sésiles y tienen menos exposición a los microbios ambientales. Las bacterias de la clase Gammaproteobacteria fueron las más numerosas en la comunidad bacteriana presente durante la segunda generación de la etapa del huevo sésil. En proporción relativa a la población total clasificada; Un menor número de Gammaproteobacteria estuvo más presente en las etapas prepupal y adulta más móviles, así como en la etapa pupal. Las gammaproteobacterias representaron el 39% de la población en la etapa de huevo. Cinco órdenes, Alteromonadales, Oceanospirillales, Enterobacteriales, Psuedomonadales y Xanthomonadales, dentro de la clase Gammaproteobacteria, estuvieron representadas en todas las etapas. *Providencia* fue la más destacada, representando el 49% de las gammaproteobacterias en todas las etapas de la vida. *Providencia* parece ser un candidato para la transmisión vertical en el soldado negro, como se encontró en adultos y huevos.

Los representantes de las familias Enterococcaceae se asociaron con etapas no vegetarianas, mientras que las Lactobacillaceae se identificaron desde la etapa del huevo. Dentro de la clase Clostridia, un orden, Clostridiales, se representó como un componente menor prepupas, pupas y adultos, pero un gran contribuyente a la comunidad bacteriana en huevos (11.1%). (Holdaway, F.1930 y seddon, H. 1931) manifierta que el amoniaco producido por la putrefacción bacteriana en ovino estimula la oviposición por moscas (Diptera: Caliphoridae), así mismo para los mosquitos hembras un factor primario que regula la

atracción y colonización de estos sitios es la flora microbiana asociada (Ponnusamy, L. 2008), donde la combinación de 14 especies de bacterias es responsable de la atracción (Ponnusamy, L. 2010); dentro de esas especies se encontró a *Providencia* sp. del cap. *Rufifacies* 3rd instar y *Acintobactersp.* de *Alphitobius diaperinus* estimulando así una respuesta significativa de la mosca soldado negra (Zheng *et al.*, 2013, y *Ignatzschineria* sp. 2 y 3 de huevos de *C. macellaria*, cuya secuenciación preliminar de gen 16S rRNA y 23S rRNA permitieron la secuenciación de estas cepas (Tsang y col. Int J Syst Evol Microbiol., 2018).

4.3. Identificación de bacterias aisladas del tracto digestivo de *Hermetia illucens* usando la espectrometría de masas maldi tof/ tof.

Los datos del MALDI TOF/TOF revelaron 61 secuencias peptídicas presentes en tracto digestivo de *H. illucens* (37 "RO" y 24 "RH"). Según el análisis realizado en BLAST, para larvas RO mostraron secuencias peptídicas que pertenecen al género: *Morganella* (24 %), *Vagococcus* (18.9 %), *Bacillus* (16.2 %), *Ignatzschineria* (16.2 %), *Lactobacillus* (8.1 %), *Proteus* (5.5 %), *Enterococcus* (2.7 %), *Paenibacillus* (2.7 %), *Citrobacter* (2.7 %), *Rhizobium* (2.7 %), bacterias cuyas secuencias se encuentran en (Cuadro 4) y (Figura. 9). Para aquellas larvas RH mostraron el 33.3 % para *Ignatzschineria* para 29.2 % para *Morganella*, 16.7 para *Bacillus*, 8.3 % para *Vagococcus*, 8.3 % para *Proteus*, 4.2 % para *Salmonella* (Cuadro 5) y (Figura. 10). Así mismo muestra que el 45.5 % de las secuencias peptídicas bacterianas son comunes en "RO" y "RH" a nivel de género: *Bacilo*, *Morganella*, *Vagococo*, *Ignatzschineria*, *Proteus* (Figura. 11).

Un análisis mostró que MALDI-TOF MS ha mostrado un alto grado de precisión en la identificación anaeróbica, aunque faltan datos para definir

su efectividad en la identificación de especies anaerobias. Por lo tanto, actualizar y perfeccionar las bases de datos son esenciales para mejorar la tasa de identificación. (Li *et al.*, 2019).

Se ha caracterizado a *M. morganii* en base a la identidad limitada de la secuencia de ADN, indicando muy pocas secuencias peptídicas que permita su completa identificación siendo estas las secuencias peptídicas: hypothetical protein MmP1_gp16 [Morganella phage MmP1] con 53 % de identidad; single-stranded DNA-binding protein [Morganella phage MmP1] con 87 %; lysozyme [Morganella phage MmP1] con 93 %; hypothetical protein MmP1_gp24 [Morganella phage MmP1] con 93 %; exonuclease [Morganella phage MmP1] con 90 %; hypothetical protein MmP1_gp32 [Morganella phage MmP1] con 74 %; hypothetical protein MmP1_gp33 [Morganella phage MmP1] con 70 %; head-to-tail joining protein [Morganella phage MmP1] con 92 %; capsid assembly protein [Morganella phage MmP1] con 80 %; tail tubular protein A [Morganella phage MmP1] con 86 %; tail tubular protein B [Morganella phage MmP1] con 88 % y DNA maturase B [Morganella phage MmP1] con 92 % (Oliveira, H *et al.* 2017). cepas de *B. clausii*, que se caracterizan por un bajo nivel de diversidad genómica intraespecífica, se expresan en diferentes niveles de proteínas codificadas por los mismos genes. El análisis del perfil de proteínas de células completas usando SDS-PAGE unidimensional se realizaron que se realizó para *Vagococcus* siendo su perfil de proteínas de células enteras y la secuenciación del gen 16S rRNA desconocido. Cepas de *Vagococcus*, el análisis de conglomerados de perfiles proteómicos mostró que todas las cepas de *Vagococcus* se distribuyeron en un grupo bien definido en función de la similitud de sus perfiles de espectro de masas. Los espectros de las cepas de *Vagococcus* mostraron altos niveles de similitud intraespecífica (87%) (Torres y Santos, 2019). Los espectros de las cepas de *Vagococcus* mostraron altos niveles de similitud intraespecífica (87%) (Torres-Corral y Santos, Y., 2019). Un estudio adicional se dirigió a detectar las que se expresaron de manera más alta y diferente en cepas de *Bacillus*,

mediante análisis de espectrometría de masas, exhibieron proteínas como alcohol deshidrogenasa (ADHA, EC1.2.1.3; ABC0046 isoforma) aldehído deshidrogenasa (DHAS, EC 1.2.1.3; ABC0047 isoforma) y proteína flagellina de *Bacillus* KSM-k16 (Lippolis *et al.*, 2011).

V. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio revelan una variabilidad bacteriana cuando se utilizan diferentes desechos como alimento para las larvas de *H. illucens*, la identificación de las especies bacterianas mediante técnicas moleculares tales como la genómica, metagenómica y Proteómica nos ha permitido obtener amplio conocimiento de los microorganismos presentes asociados al tracto digestivo de *H. illucens*, los cuales ayudan en la degradación de los residuos (*Bacillus*) y en la oviposición de la mosca (*Klebsiella*, *Ignatzschineria*, *Morganella*, *Providencia*, *Proteus*); la genómicas y metagenómica mediante secuencias nucleotídicas, sin embargo el Espectrómetro de masas “proteómica” con secuencias peptídicas aquellas que nos ha permitido confirmar dicha microbiota, técnica que nos ha permitido estar a la vanguardia.

VI. RECOMENDACIONES

Medir la influencia de la preferencia bacteriana en la oviposición de adultos hembras *H.illucens* al igual que la concentración bacteriana de dichos microorganismos; ya sea individual o en consorcio.

Identificar los compuestos volátiles microbianos emitidos que sirven como el mecanismo que regula la posterior atracción de insectos, colonización de *H. illucens*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Archie, E. A., & Tung, J. (2015). Social behavior and the microbiome. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 6, 28-34.
- Breznak, J. A., & Brune, A. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual review of entomology*, 39(1), 453-487.
- Bonelli, M., Bruno, D., Caccia, S., Sgambetterra, G., Cappellozza, S., Jucker, C & Casartelli, M. (2019). Structural and Functional Characterization of *Hermetia illucens* Larval Midgut. *Frontiers in physiology*, 10.
- Čičková, H., Newton, G. L., Lacy, R. C., & Kozánek, M. (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste management*, 35, 68-80.
- Chen, B., Teh, B. S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., & Shao, Y. (2016). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific reports*, 6, 29505.
- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., y Van Campenhout, L. (2018). Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(9), e02722-17.
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 263-272.
- Hoc, B., Noël, G., Carpentier, J., Francis, F., & Megido, R. C. (2019). Optimization of black soldier fly (*Hermetia illucens*) artificial reproduction. *PloS one*, 14(4), e0216160.

- Holdaway, F. G. (1930). Field populations and natural control of *Lucilia sericata*. *Nature*, 126(3182), 648.
- Hussain, A., Zhang, M., Üçpınar, H. K., Svensson, T., Quillery, E., Gompel, N & Kadow, I. C. G. (2016). Ionotropic chemosensory receptors mediate the taste and smell of polyamines. *PLoS biology*, 14(5), e1002454.
- Janzen, D. H. (1977). Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. *The American Naturalist*, 111(980), 691-713.
- Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S. B., Choi, Y., & Lee, S. J. (2011). The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Current microbiology*, 62(5), 1390-1399. doi:10.1007/s00284-011-9874-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lam, K., Babor, D., Duthie, B., Babor, E. M., Moore, M., & Gries, G. (2007). Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. *Animal Behaviour*, 74(1), 81-92.
- Lam, K., Thu, K., Tsang, M., Moore, M., & Gries, G. (2009). Bacteria on housefly eggs, *Musca domestica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. *Naturwissenschaften*, 96(9), 1127-1132.
- Li, Y., Shan, M., Zhu, Z., Mao, X., Yan, M., Chen, Y., Gu, B. (2019). Aplicación de MALDI-TOF MS para la identificación rápida de bacterias anaerobias. *Enfermedades infecciosas BMC*, 19 (1). doi: 10.1186 / s12879-019-4584-0.
- Lippolis, R., Gnoni, A., Abbrescia, A., Panelli, D., Maiorano, S., Paternoster, M. S., Gaballo, A. (2011). Comparative proteomic analysis of four *Bacillus clausii* strains: Proteomic expression signature distinguishes protein profile of the strains. *Journal of Proteomics*, 74(12), 2846–2855. doi:10.1016/j.jprot.2011.06.032.

- Ma, Q., Fonseca, A., Liu, W., Fields, A. T., Pimsler, M. L., Spindola, A. F., & Wood, T. K. (2012). *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. *The ISME journal*, 6(7), 1356-1366.
- Qiao, H., Keeseey, I. W., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2019). Gut microbiota affects development and olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 222(5), jeb192500.
- Oliveira, H., Pinto, G., Oliveira, A., Noben, J.-P., Hendrix, H., Lavigne, R., Azeredo, J. (2017). *Characterization and genomic analyses of two newly isolated Morganella phages define distant members among Tevenvirinae and Autographivirinae subfamilies. Scientific Reports*, 7(1). Doi: 10.1038/srep46157
- Ohkuma, M., & Kudo, T. (1996). Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2), 461-468.
- Pérez, D. R. (2012). Estudio de la diversidad de la microbiota intestinal en función de la diferente dieta en *Thorectes lusitanicus*. *REDUCA*, 4(15).
- Ponnusamy, L., Xu, N., Nojima, S., Wesson, D. M., Schal, C., & Apperson, C. S. (2008). Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9262-9267.
- Ponnusamy, L., Wesson, D. M., Arellano, C., Schal, C., & Apperson, C. S. (2010). Species composition of bacterial communities influences attraction of mosquitoes to experimental plant infusions. *Microbial ecology*, 59(1), 158-173.
- Pinto-Tomas AA et al.. Fijación simbiótica de nitrógeno en los jardines de hongos de las hormigas cortadoras de hojas. *Science* 326, 1120–1123 (2009).

- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- Sebastiana, M., Figuraeiredo, A., Monteiro, F., Martins, J., Franco, C., Coelho, A. y Ferreira, S. (2013). A possible approach for gel-based proteomic studies in recalcitrant woody plants. *Springer Plus* 2(1): 210.
- Seddon, H. R. (1931). Conditions which predispose sheep to blowfly attack. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 42(pt. 8).
- Torres-Corral, Y., & Santos, Y. (2019). Identification and typing of *Vagococcus salmoninarum* using genomic and proteomic techniques. *Journal of Fish Diseases*. doi:10.1111/jfd.12967
- Tsang CC, Tang JYM, Fong JYH y col. Ignatzschineria cameli sp. nov., aislado del tejido necrótico del pie de dromedarios (Camelus dromedarius) y gusanos asociados (especies de Wohlfahrtia) en Dubai. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68 (11): 3627–3634. doi: 10.1099 / ijsem.0.003046.
- Vogel, H., Müller, A., Heckel, D. G., Gutzeit, H., & Vilcinskis, A. (2018). Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 141-148.
- Wang, Y. S., & Shelomi, M. (2017). Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods*, 6(10), 91.
- Wong, A. C. N., Wang, Q. P., Morimoto, J., Senior, A. M., Lihoreau, M., Neely, G. G., & Ponton, F. (2017). Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in *Drosophila*. *Current Biology*, 27(15), 2397-2404.

VIII. ANEXOS

Cuadro 1. Identificación de especies bacterianas del intestino de larvas de *H. illucens* con ROD, utilizando un enfoque independiente del cultivo con el gen 16S rRNA.

OTU	Especies	Abundancia	OTU	Especies	Abundancia
1	<i>klebsiella spp.</i>	17309	45	<i>pantoea spp.</i>	17
2	<i>proteus vulgaris</i>	8367	46	<i>enterococcus faecium</i>	16
3	<i>pantoea agglomerans</i>	7064	47	<i>enterococcus raffinosus</i>	16
4	<i>ignatzschineria sp.</i>	6080	48	<i>enterococcus termitis</i>	14
5	<i>citrobacter werkmanii</i>	2805	49	<i>granulicatella paradiacens</i>	14
6	<i>pseudomonas aeruginosa</i>	2401	50	<i>clostridium sp.</i>	13
7	<i>enterobacter cloacae</i>	2242	51	<i>proteus sp.</i>	13
8	<i>cozenzaea proteus myxofaciens</i>	2154	52	<i>enterococcus hirae</i>	12
9	<i>klebsiella sp.</i>	2071	53	<i>enterococcus casseliflavus</i>	11
10	<i>enterobacter spp.</i>	1685	54	<i>aeromonas hydrophila</i>	9
11	<i>klebsiella oxytoca</i>	1504	55	<i>enterococcus sp.</i>	9
12	<i>enterococcus faecalis</i>	1493	56	<i>lactococcus garvieae</i>	9
13	<i>enterobacter kobei</i>	1487	57	<i>enterobacter asburiae</i>	8
14	<i>salmonella enterica</i>	1368	58	<i>providencia spp.</i>	7
15	<i>enterobacter hormaechei</i>	1361	59	<i>rhizobium spp.</i>	7
16	<i>raoultella terrigena</i>	936	60	<i>morganella morganii</i>	5
17	<i>lactococcus lactis</i>	725	61	<i>acinetobacter sp</i>	4
18	<i>providencia sp.</i>	702	62	<i>enterobacter cancerogenus</i>	4
19	<i>enterobacter ludwigii</i>	677	63	<i>enterococcus lactis</i>	4
20	<i>candidatus nardonella endosymbiont</i>	619	64	<i>lachnoclostridium clostridium</i>	3
21	<i>lelliottia amnigena</i>	457	65	<i>methylobacterium aquaticum</i>	3
22	<i>enterobacter sp.</i>	443	66	<i>serratia ureilytica</i>	3
23	<i>klebsiella pneumoniae</i>	415	67	<i>bacillus sp.</i>	2
24	<i>klebsiella variicola</i>	330	68	<i>lactococcus sp.</i>	2
25	<i>providencia rustigianii</i>	327	69	<i>salmonella spp.</i>	2
26	<i>erwinia sp.</i>	276	70	<i>vagococcus fluvialis</i>	2
27	<i>cedeece lapagei</i>	252	71	<i>aeromonas spp.</i>	1
28	<i>proteus mirabilis</i>	166	72	<i>enterococcus mundtii</i>	1
29	<i>enterococcus villorum</i>	144	73	<i>enterococcus sulfureus</i>	1
30	<i>enterococcus durans</i>	94	74	<i>hafnia sp.</i>	1
31	<i>citrobacter spp.</i>	68	75	<i>marinobacter spp.</i>	1
32	<i>kluyvera ascorbata</i>	55	76	<i>paenibacillus glucanolyticus</i>	1
33	<i>proteus spp.</i>	53	77	<i>paenibacillus glucanolyticus</i>	1
34	<i>erwinia piriflorinigrans</i>	50	78	<i>pantoea dispersa</i>	1
35	<i>citrobacter sp.</i>	46	79	<i>pantoea oleae</i>	1
36	<i>providencia rettgeri</i>	31	80	<i>paracoccus marcusii</i>	1
37	<i>erwinia agglomerans</i>	29	81	<i>pseudalteromonas sp.</i>	1
38	<i>enterococcus spp.</i>	28	82	<i>roseobacter spp.</i>	1
39	<i>lactococcus spp.</i>	28	83	<i>shigella dysenteriae</i>	1
40	<i>kluyvera intermedia</i>	25	84	<i>shigella flexneri</i>	1
41	<i>citrobacter braakii</i>	23	85	<i>thalassiosira rotula</i>	1
42	<i>salmonella sp.</i>	21	86	<i>turicibacter spp.</i>	1
43	<i>providencia alcalifaciens</i>	19	87	<i>vibrio spp.</i>	1
44	<i>serratia sp.</i>	18			

Cuadro 2. Identificación de especies bacterianas del intestino de larvas de *H. illucens* con RHD, utilizando un enfoque independiente del cultivo con el gen 16S ARNr.

OTU	Especies	Abundancia
1	<i>ignatzschineria larvae</i>	7711
2	<i>vagococcus fluvialis</i>	6439
3	<i>vagococcus carniphilus</i>	763
4	<i>xanthomonas vesicatoria</i>	206
5	<i>pseudomonas sp.</i>	188
6	<i>ramlibacter tataouinensis</i>	129
7	<i>comamonas spp.</i>	121
8	<i>cerasibacillus quisquiliarum</i>	105
9	<i>corynebacterium spp.</i>	101
10	<i>kocuria sp.</i>	66
11	<i>pelomonas aquatica</i>	53
12	<i>ignatzschineria schineria sp.</i>	50
13	<i>pelobacter spp.</i>	49
14	<i>thermaerobacter spp.</i>	45
15	<i>enterococcus faecalis</i>	42
16	<i>streptomyces sp.</i>	18
17	<i>proteus vulgaris</i>	14
18	<i>enterococcus villorum</i>	11
19	<i>granulicatella paradiacens</i>	10
20	<i>pseudoxanthomonas spp.</i>	6
21	<i>acidovorax konjaci</i>	5
22	<i>enterococcus durans</i>	5
23	<i>enterococcus eurekensis</i>	5
24	<i>cosenzaea proteus</i>	3
25	<i>curvibacter spp.</i>	2
26	<i>enterococcus spp.</i>	2
27	<i>mitsuaria sp.</i>	2
28	<i>delftia acidovorans</i>	1
29	<i>delftia spp.</i>	1
30	<i>enterococcus raffinosus</i>	1
31	<i>enterococcus sp.</i>	1
32	<i>ideonella sp.</i>	1
33	<i>kocuria rhizophila</i>	1
34	<i>lactococcus lactis</i>	1
35	<i>methylibium spp.</i>	1
36	<i>nannochloropsis granulata</i>	1
37	<i>nesterenkonia</i>	1
38	<i>paenibacillus glucanolyticus</i>	1
39	<i>pelomonas pseudomonas</i>	1
40	<i>pseudoalteromonas sp.</i>	1
41	<i>pseudoalteromonas spp.</i>	1
42	<i>streptococcus infantis</i>	1

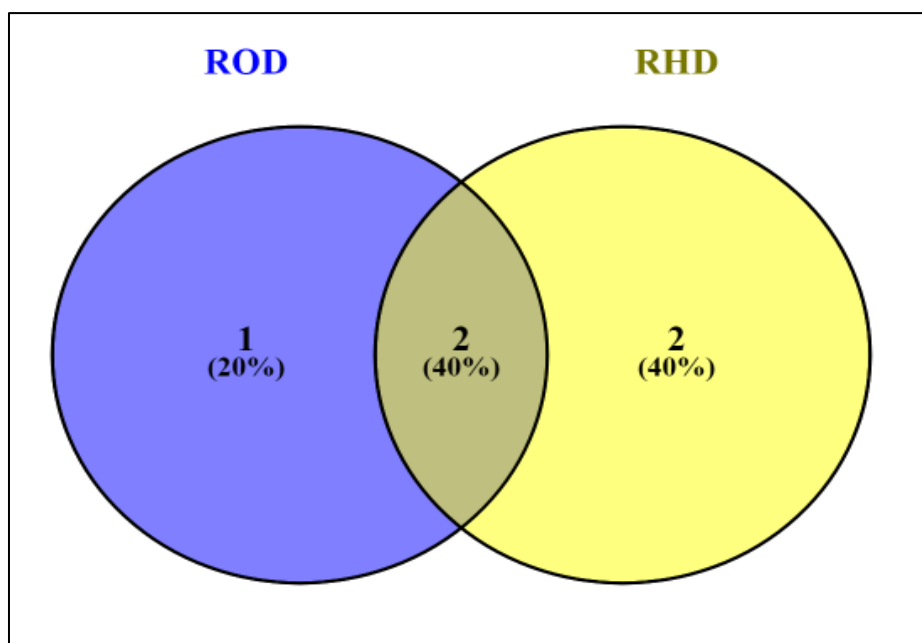


Figura 1. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **phylum** en 2 dietas "ROD" y "RHD": 2 fueron comunes en "ROD" y "RHD": proteobacterias y firmicutes; 1 incluido exclusivamente en "ROD": bacillariophyta; 2 incluidos exclusivamente en "RHD": actinobacterias y eustigmatophyceae.

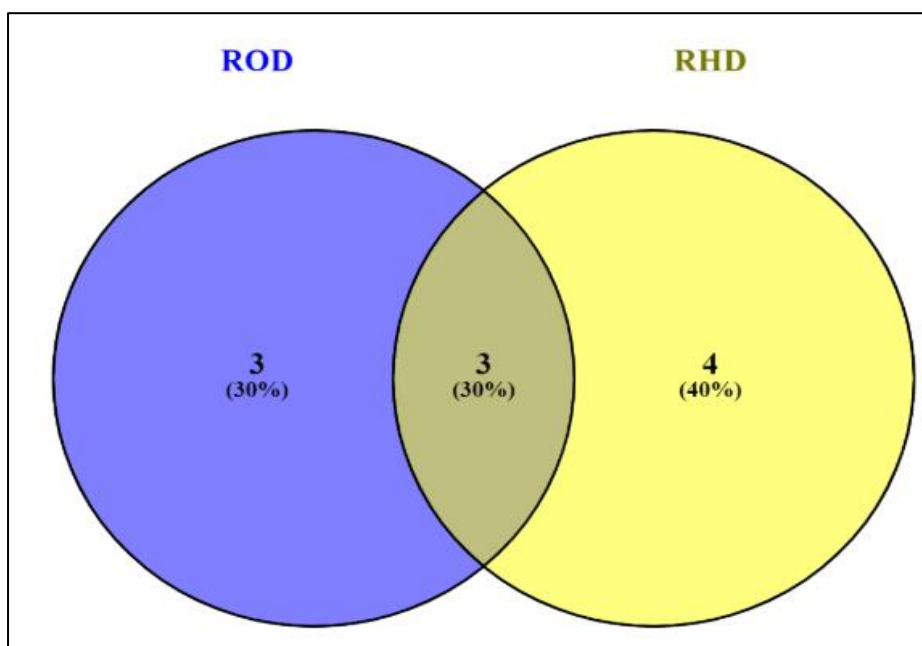


Figura 2. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **clase** en 2 dietas "ROD" y "RHD": 3 clases fueron comunes en "ROD" y "RHD": gammaproteobacteria, bacilos, clostridia; 3 incluidos exclusivamente en "ROD": alfarproteobacteria, erysipelotrichia y coscinodiscophyceae; 4 incluidos exclusivamente en "RHD": betaproteobacterias, actinobacterias, deltaproteobacteria y eustigmatophyceae.

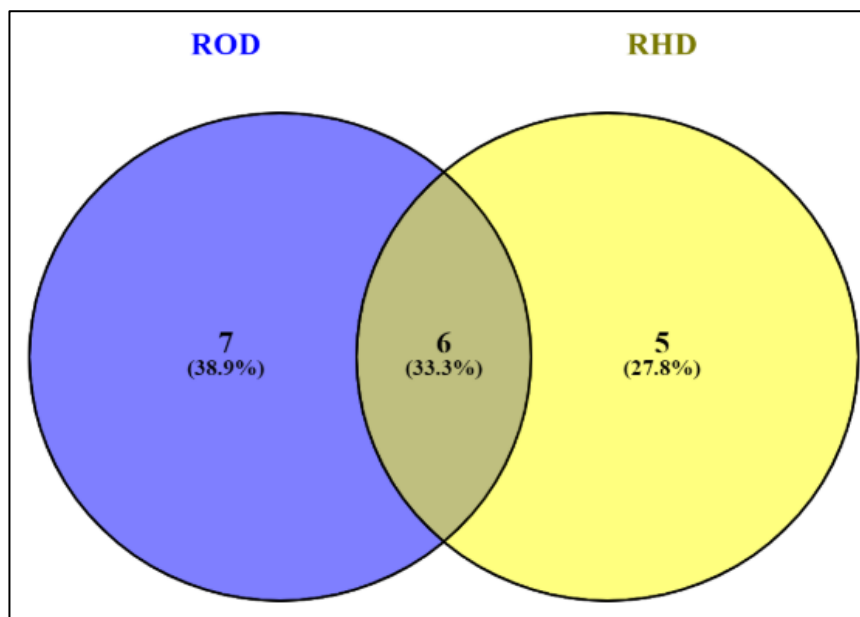


Figura 3. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H.illucens* a nivel de Orden en 2 dietas "ROD" y "RHD": 6 ordenes fueron comunes en "ROD" y "RHD": alteromonadales, bacillales, clostridiales, enterobacteriales, lactobacillales y pseudomonadales; 7 incluidos exclusivamente en "ROD": aeromonadales, erysipelotrichales, gammaproteobacteria, rizobiales, rhodobacterales, thalassiosirales y vibrionales; 5 incluidos exclusivamente en "RHD": actinomicetales, burkholderiales, desulfuromonadales, eustigmatales y xanthomonadales.

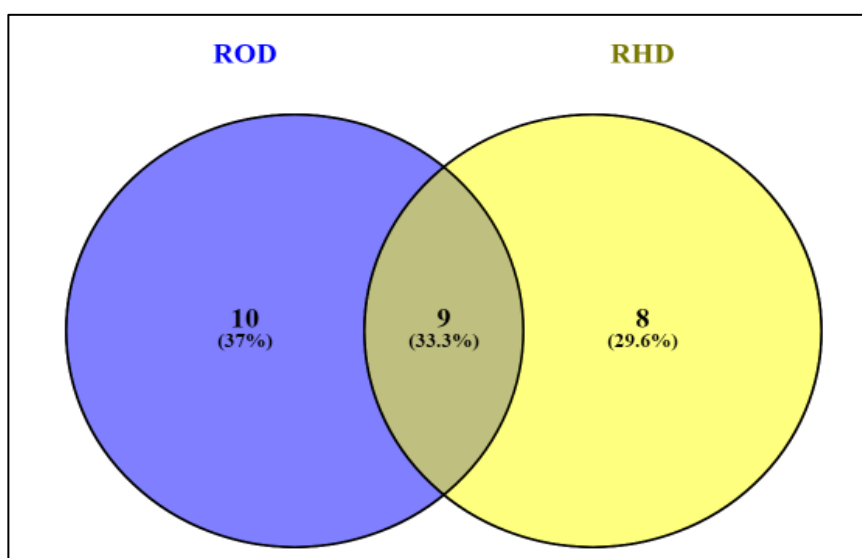


Figura 4. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H.illucens* a nivel de **familia** en 2 dietas "ROD" y "RHD": 9 familias fueron comunes en "ROD" y "RHD": bacillaceae, Carnobacteriaceae, Clostridiaceae, enterobacteriaceae, enterococcaceae, paenibacillaceae, pseudoalteromonadaceae, pseudomonadaceae y streptococcaceae; 10 incluidos exclusivamente en "ROD": aeromonadaceae, alteromonadaceae, gammaproteobacteria, lachnospiraceae, methylobacteriaceae, moraxellaceae, rhizobiaceae, rhodobacteraceae, thalassiosiraceae y vibrionaceae; 8 incluidos exclusivamente en "RHD": burkholderiales, comamonadaceae, corynebacteriaceae, micrococcaceae, monodopsidaceae, pelobacteraceae, Streptomycetaceae y xanthomonadaceae.

Cuadro 3. Bacterias aisladas de intestinos de larvas de *H. illucens* identificadas por análisis de secuencia del gen 16S ADNr.

Nº de aislamiento	Genero	Especies predichas	Accesión a GenBank	Similitud (%)
7	Acinetobacter	<i>A. junii</i> strain FC2961 16S ribosomal RNA gene	MH532493.1	100%
3	Bacillus	<i>Bacillus. sp.</i> (in: Bacteria) strain M-230 16S ribosomal RNA gene	HQ334981.1	100%
7	Enterococcus	<i>E. faecalis</i> strain FC chromosome, complete genome	CP028835.1	100%
8	Ignatzschineria	<i>I. indica</i> strain FFA1 16S ribosomal RNA gene	NR_116120.1	99%
7	Klebsiella	<i>K. pneumoniae</i> strain KP1 16S ribosomal RNA gene	MK881026.1	99.80%
10	Morganella	<i>M. morganii</i> strain AR_0133 chromosome, complete genome	CP028956.1	99.40%
1	Morganella	<i>M. psychrotolerans</i> strain U2/3 16S ribosomal RNA gene	NR_117794.1	98%
6	Proteus	<i>P. mirabilis</i> strain PmBC1123 chromosome	CP034091.1	100%
11	Proteus	<i>P. vulgaris</i> strain 201901145 16S ribosomal RNA gene	KY118917.1	99.50%
16	Providencia	<i>P. rettgeri</i> strain DSM 4542 16S ribosomal RNA	NR_042413.1	99%
5	Vagococcus	<i>V. fluvialis</i> strain M-29c 16S ribosomal RNA gene	NR_026489.1	99%

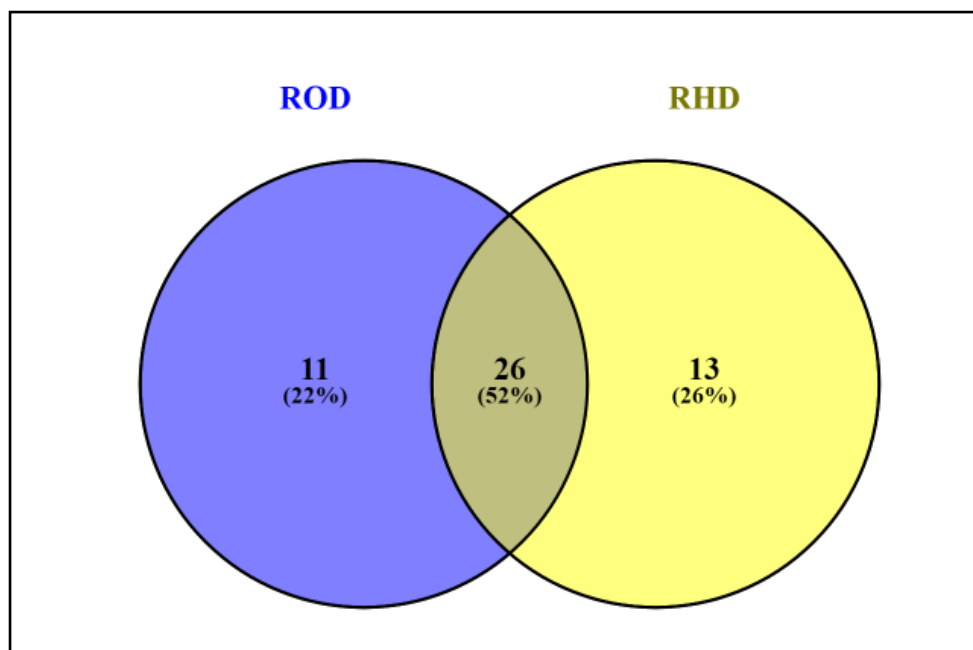


Figura 5. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **Genero** en 2 dietas "ROD" y "RHD": 26 géneros fueron comunes en "ROD" y "RHD": *Klebsiella*, *ignatzschineria*, *Proteus*, *enterobacter*, *pantoea*, *citrobacter*, *pseudomonas*, *cosenzaea*, *enterococo*, *raoultella*, *providencia*, *lactococcus salmonella*, *candidatus*, *nardonella*, *lelliottia*, *erwinia*, *cedecea*, *kluuvera*, *serratia*, *granulicatella*, *clostridium*, *morganella*, *acinetobacter*, *bacillus*, *marinobacter* y *vibrio*; 11 incluidos exclusivamente en "ROD": *aeromonas*, *rizobio*, *metilobacteria*, *lachnoclostridium*, *vagococcus*, *thalassiosira*, *roseobacter*, *paracoco*, *paenibacillus*, *pseudoalteromonas* y *Turicibacter*; 13 incluidos exclusivamente en "RHD": *lactobacillus*, *corynebacterium*, *ruminobacter*, *oceanospirillum*, *oceanimonas*, *acetobacter*, *edwardsiella*, *prasinoderma*, *shewanella*, *microvirga*, *eionea*, *esfingomonas* y *escherichia*.

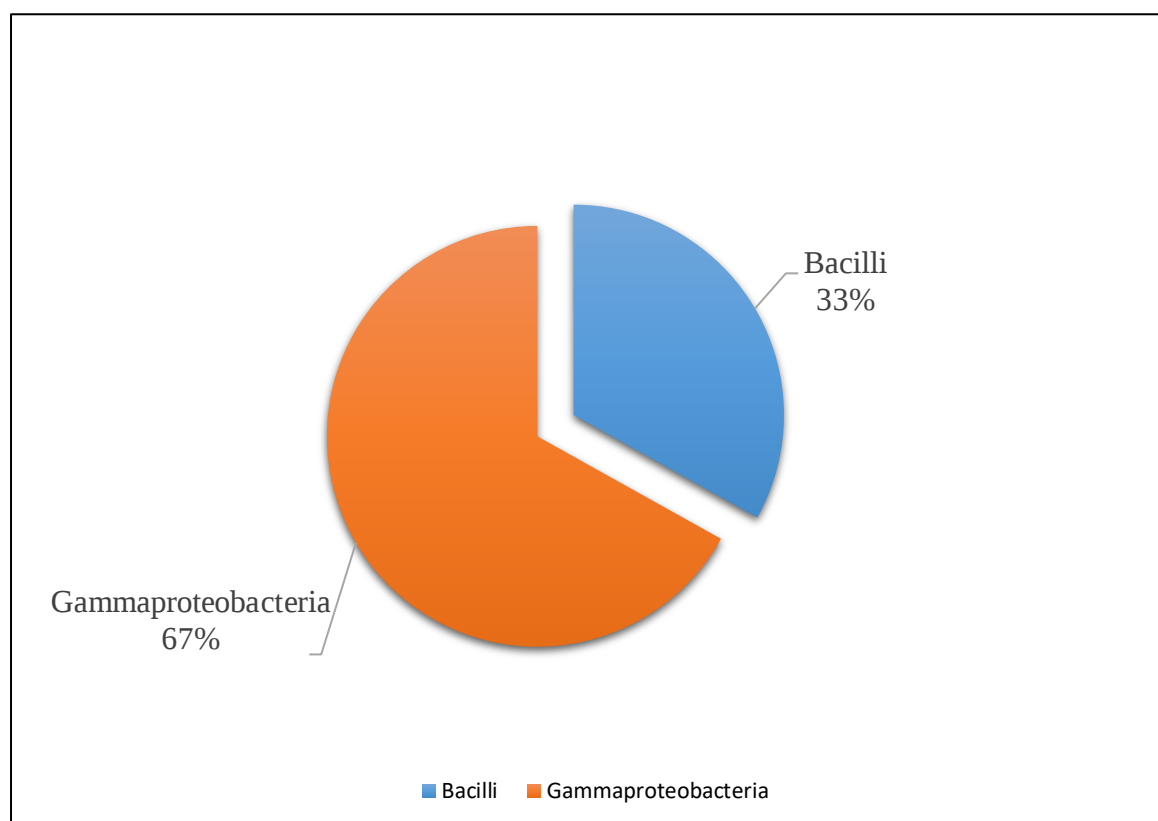


Figura 6. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **clase** en 2 dietas "ROC" y "RHC": El 67 % de las bacterias cultivables pertenecían a la clase Gammaproteobacteria y un 33 % pertenecían a la clase Bacilli.



Figura 7. Porcentaje de la Abundancia de la comunidad bacteriana del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* por su abundancia. **A:** comunidad bacteriana del tracto digestivos de larvas de *H. illucens* en RHC. **B:** Comunidad bacteriana del tracto digestivos de larvas de *H. illucens* ROC.

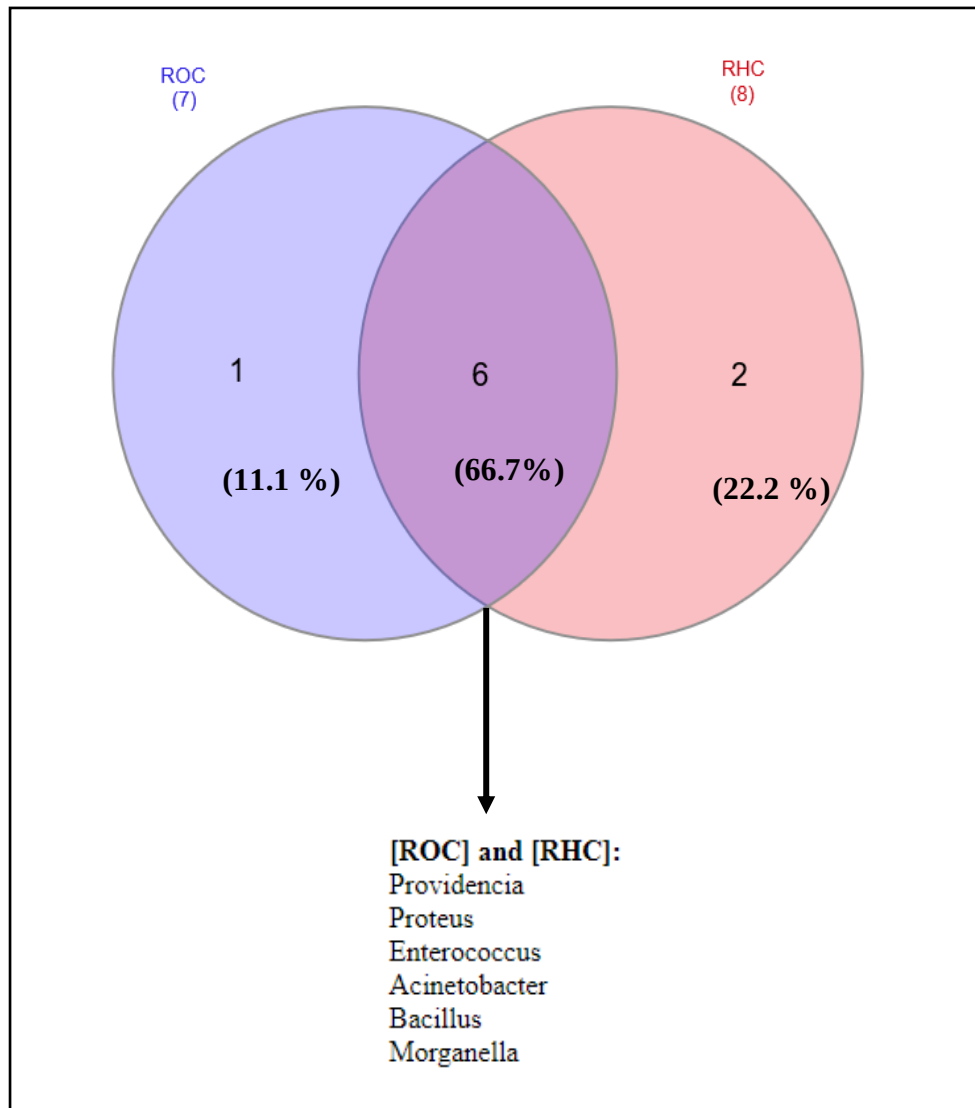


Figura 8. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **Genero** en 2 dietas "ROC" y "RHC": 6 géneros fueron comunes en "ROC" y "RHC": Providencia, Proteus, enterococo, acinetobacter, Bacilo y morganella. 1 fueron incluido exclusivamente en "ROC": *Klebsiella*. 2 fueron incluidos exclusivamente en "RHC": Ignatzschineria, Vagococo y Vagococcus

Cuadro 4. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* RO, identificadas mediante MALDI TOF/TOF.

Abundancia %	Secuencia Peptídica	Descripción	Identidad %	Accession
24.30%	HGGKTIILARFIPIVR	16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase RsmG [Morganella morganii]	100%	WP_112549643.1
	DGIVLFDSRNPATEE WR	class I SAM-dependent methyltransferase [Morganella morganii]	100%	WP_052927619.1
	VPLNFSAPYLATNLKE FWAR	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltB [Morganella morganii]	100%	VDY32741.1
	YAKQQWIAAFAENGIS TKEQLSAGMR	DNA replication protein [Morganella morganii]	100%	WP_107679346.1
	NAGILEQYQIELLGTK	DUF2867 domain-containing protein [Morganella morganii]	100%	WP_107678208.1
	LPVGHLLNPSDLFTW SVMRR	DUF968 domain-containing protein [Morganella morganii]	100%	WP_108656734.1
	NLYINANRFDNNDNFL SAR	filamentous hemagglutinin N-terminal domain-containing protein [Morganella morganii]	100%	WP_153642419.1
	VGNGKDTFYNTNINW MAGFNYGGWR	fimbrial biogenesis outer membrane usher protein [Morganella morganii]	100%	WP_108656365.1
	TKALLLAAGKGSVVAIDI GCINESHYFINMATGG FGPK	lipid kinase YegS [Morganella morganii]	100%	WP_108656837.1
18.90%	NLTAGEIVAQIMQVQH YFDQREEDER	23S rRNA (adenine(2503)-C(2))-methyltransferase RlmN [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_086951556.1
	MAVKNMVQAINALT QEMKR	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_086343086.1
	IQNNLDYLAKSTGMG SQIAGGLAALPSESAR	carbohydrate ABC transporter permease [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_086342588.1
	RKNFASDSDPSCPLC GSKMIDGIR	DUF916 and DUF3324 domain-containing protein [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_114289525.1
	ANGKMIVIDGGFSKPY QK	fructose-1,6-bisphosphatase [Vagococcus sp. 2B-2]	100%	WP_136136674.1
	IIRASGGGFKYAKGIG VMLEDR	glutamate formimidoyltransferase [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_086342384.1
	WYGQFRVLTDCSTDV K	helix-turn-helix domain-containing protein [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_086951563.1
16.20%	VPVEPITVDIHLAHD GRGVAK	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236918.1
	AGMVIIIPATDDWHMH NTDGQK	adenosine deaminase [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236372.1
	VPLISATGSTRMGQEV APKVAARFGR	aldehyde dehydrogenase family protein [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236410.1
	PGMTNHSVLPLAANR AGISFER	D-alanine--D-alanine ligase [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109235901.1
	VPKDTRSEEIMSAFVG QYYGEHR	excinuclease ABC subunit UvrC [Ignatzschineria sp. F8392]	100%	WP_094567696.1
	EGATEATAFLKKFGNE DR	helix-turn-helix transcriptional regulator [Ignatzschineria sp. F8392]	100%	WP_094567085.1

Continuación

16.20%	DQKAIQTIHENIKMCR	16S rRNA (guanine(966)-N(2))-methyltransferase RsmD [Bacillus sp. MRMR6]	100%	WP_075685265.1
	FNSVLTTNGAEIEKVN EMGKR	30S ribosomal protein S6 [Bacillus okhensis]	100%	WP_034628904.1
	GDFVGSGLITVRDAERR	carbamoyl-phosphate synthase large subunit [Bacillus sp. 7520-S]	100%	WP_095237615.1
	EMMHEDGSFFSALDA DTEGR	Cellobiose 2-epimerase [Bacillus velezensis]	100%	ASS62651.1
	KMELRGQGEGQTFAC VCGHR	DNA topoisomerase III [Bacillus velezensis UCMB5033]	100%	CDG28397.1
	NKKGRWYWRNSSTDR	malate:quinone oxidoreductase [Bacillus coagulans]	100%	WP_061566047.1
8.10%	ARNNEELEEQSATIPKR	anthranilate phosphoribosyltransferase [Lactobacillus mixtipabuli]	100%	GAW99883.1
	GLKALTYDLGNHKNV R	ATP-dependent helicase [Lactobacillus salivarius]	100%	WP_134354551.1
	QLAHDGHELVVYVPCR	DNA-formamidopyrimidine glycosylase [Lactobacillus parabuchneri]	100%	WP_084975282.1
5.50%	CGFTSHALYWHCPSC RSWDTIKPIR	lipopolysaccharide assembly protein LapB [Proteus mirabilis]	96%	<u>TFT23811.1</u>
	GRNVVLDKSFVAPV TKDGVSVAREIELEDK FENM	molecular chaperone GroEL [Proteus mirabilis]	97%	<u>RYI03578.1</u>
2.70%	VGISLSGNGKDLKRP PPGQHGPGR	30S ribosomal protein S4 [Paenibacillus sp. Soil766]	100%	WP_057314783.1
2.70%	HGRYDAHLIHNGVNE PR	glycosyltransferase family 4 protein [Citrobacter freundii]	100%	WP_109908422.1
2.70%	APKEPAPRR	SPOR domain-containing protein [Rhizobium sp. RU36D]	100%	WP_084364216.1
2.70%	IEVNSELEVIGESIEQAI ELLNDEGR	16S rRNA (cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase RsmH [Enterococcus sp. 6C8_DIV0013]	100%	WP_086341248.1

Cuadro 5. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* RH, identificadas mediante MALDI TOF/TOF

ABUNDANCIA %	SECUENCIAS PEPTÍDICAS	DESCRIPCION	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
33,30%	VPVEPITVDIHDLAHDGRGVAK	23S rRNA (uracil(1939)-C(5))-methyltransferase RlmD [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236918.1
	DAWQKLPQFK	4-hydroxy-3-polyprenylbenzoate decarboxylase [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236468.1
	DENDAKSVMQK	ABC transporter ATP-binding protein [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109235456.1
	KASPQDRQQNRSQLMK	ATP-binding protein [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109235448.1
	AANHLDISSSVLSR	LysR family transcriptional regulator [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109235364.1
	FGETLGENHAPKQNSWLDKAK	molecular chaperone DnaJ [Ignatzschineria larvae]	100%	WP_026879163.1
	MNQQTRIAVLGAGPSGLAQLRAFQTLR	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109235707.1
29,20%	EGELHAQVQAGKEELGNNYK	RNA-binding transcriptional accessory protein [Ignatzschineria indica]	100%	WP_109236200.1
	QLMTQFSYNSVMQVPR	50S ribosomal protein L5 [Morganella morganii]	100%	WP_046895371.1
	AVMADIGR	autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein [Morganella morganii]	100%	WP_112549783.1
	PLNMGMTQDAARERALQCLEMLDIVR	Cobalt import ATP-binding protein CbiO [Morganella morganii]	100%	SPX91314
	ADEHHRYFWDR	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II [Morganella morganii]	100%	VDY34551.1
	GGNGGRSFGGNRR	DEAD/DEAH family ATP-dependent RNA helicase [Morganella morganii]	100%	WP_107680072.1
	REVLLENKQVPLGHDNAIPTITDVAR	Ethanolamine utilization protein eutQ [Morganella morganii]	100%	VDY35774.1
16,70%	EKYATKMTSAEGR	Macrodomain Ter protein [Morganella morganii]	100%	VDY35089.1
	DVVTEMAIGVDLTLR	fumarylacetoacetate hydrolase family protein [Bacillus clausii]	100%	WP_011246337.1
	WEMEATTDGGYEVRFDDL	metal-dependent hydrolase [Bacillus clausii]	100%	WP_062749958.1
	QNVPTLKDSDTLAEEGVR	transketolase [Bacillus clausii]	100%	WP_095237023.1
	GEVMIGQFTEHTSAVKVR	trp RNA-binding attenuation protein MtrB [Bacillus sp. Marseille-P3800]	100%	WP_099300867.1
8,30%	CGFTSHALYWHCPSCRSWDTIKPIR	lipopolysaccharide assembly protein LapB [Proteus mirabilis]	96%	TFT23811.1
	GRNVVLDKSFGAPVVT KDGVSVAREIELEDKFENM	molecular chaperone GroEL [Proteus mirabilis]	97%	RYI03578.1
8,30%	QIKEDSKVLDVCAAPGGK	16S rRNA (cytosine967-C5)-methyltransferase [Vagococcus fluvialis]	100%	RCX14652.1
	RILPVDTELRRSGSGSGRRAACAPSGR	16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase RsmG [Vagococcus fluvialis]	100%	WP_114290357.1
4,20%	DKLENCMENK	hypothetical protein [Salmonella enterica subsp. enterica]	100%	ECI4628491.1

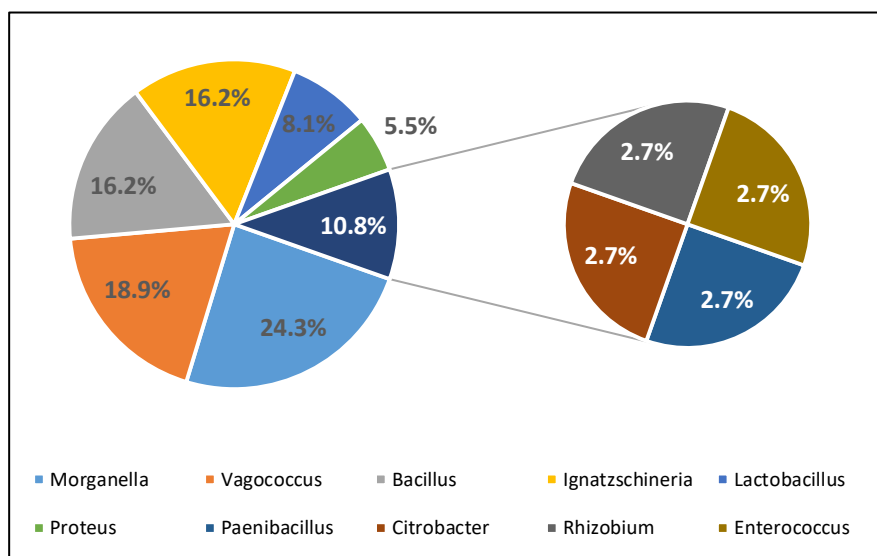


Figura 9. Abundancia en porcentaje de las secuencias peptídicas según su género en larvas RO: Morganella (24 %), Vagococcus (18.9 %), bacillus (16.2 %), Ignatzschineria (16.2 %), Lactobacillus (8.1 %), Proteus (5.5 %), Enterococcus (2.7 %), Paenibacillus (2.7 %), Citrobacter (2.7 %), Rhizobium (2.7 %).

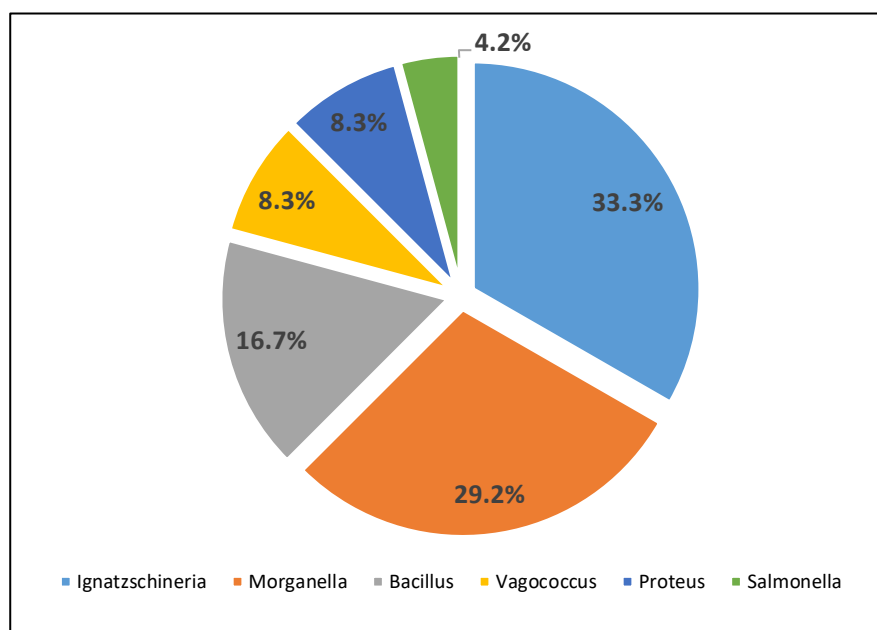


Figura 10. Abundancia en porcentaje de las secuencias peptídicas según su género en larvas RH: larvas RH mostraron el 33.3 % para Ignatzschineria para 29.2 % para Morganella, 16.7 para Bacillus, 8.3 % para Vagococcus, 8.3 % para Proteus, 4.2 % para Salmonella.

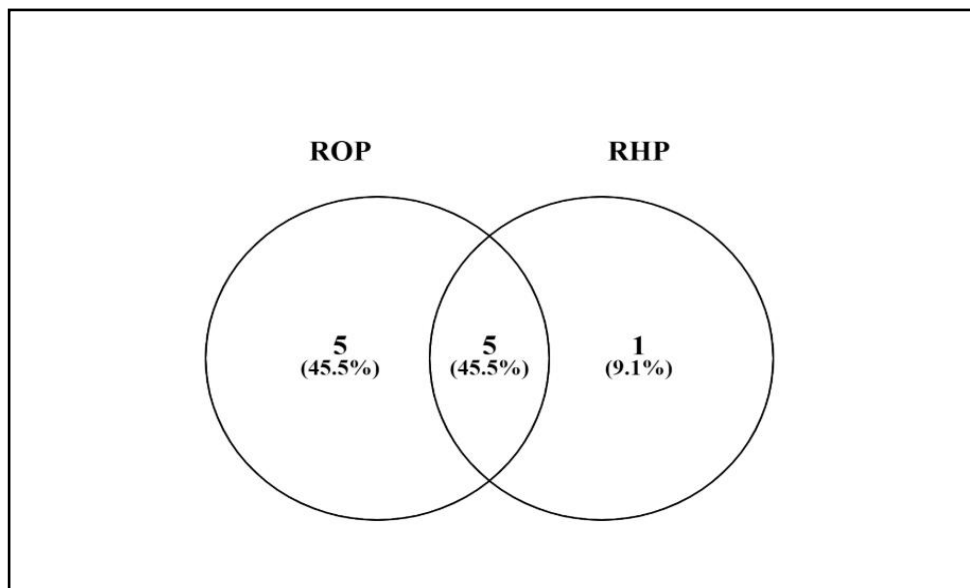


Figura 11. Bacterias del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* a nivel de **Género** en 2 dietas "ROC" y "RHC" según espectrometría de masas MALDI TOF/TOF: 5 géneros fueron comunes en "RO" y "RH": *Bacillus*, *Morganella*, *Vagococcus*, *Ignatzschineria*, *Proteus*. 5 generos incluidos exclusivamente in "RO": *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Citrobacter*, *Rhizobium*, *Enterococcus*. 1 genero incluido exclusivamente "RH": *Salmonella*



Figura 12. Crianza de *Hermetia illucens* y muestreo



Figura 13. Desinfección externa de larvas

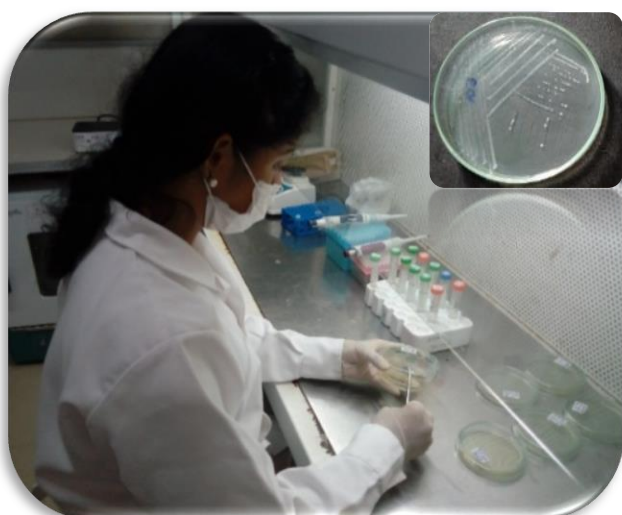


Figura 14. Aislamiento de la microbiota intestinal de las larvas de *H. illucens*



Figura 15. Amplificación del ADNr 16S mediante PCR “Reacción en cadena de la polimerasa”



Figura 16. Extracción del ADN Metagenómico del tracto digestivo de *H. illucens*



Figura 17. Electroforesis

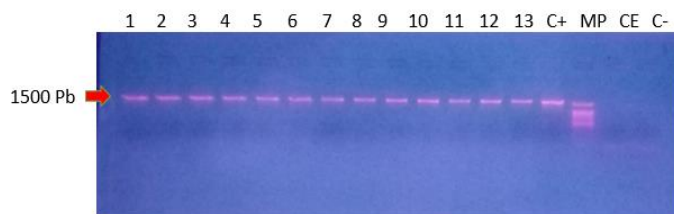


Figura 18. Revelado del gel del gen 16rRNA

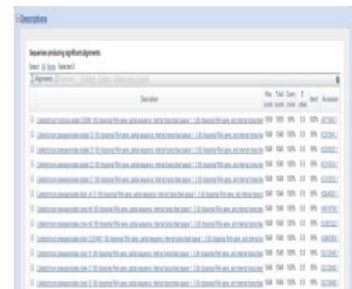


Figura 19. Alineamiento de secuencias



Figura 20. Extracción de proteínas de la microbiota aislada del tracto digestivo de *H. illucens*

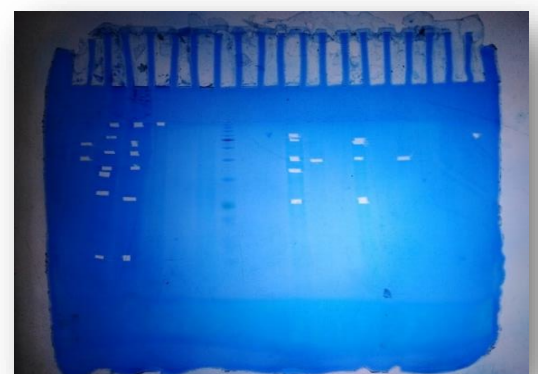


Figura 21. Separación y digestión de proteínas en electroforesis en gel unidimensional



Figura 22. Procesamiento de datos en espectrometro de masas “MALDI TOF/ TOF”.

ProteinLab - Software - Results - C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\proteomas\MS2019\Anexo1\ANEX1\MS2019\ANEX1\MS2019-01

File Config Window Help

Workflow Tools

Identity matrix

1.C...

Spot Based (MS only)...

Spot Based (MS and MS/MS)...

View

Analysis Log...

Result...

Export...

Peptide Summary...

Protein Summary...

Protein ID

Spectra

Summary Statistics

Proteins Detected

N	Unused	Total	% Cys	Accession	Name	Species/Peptide(s)/Protein	Biological Processes/Molecular Functions	PAINTED ID
1	0.00	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	CD-Pravencia reagent 32M 131 01-02-000 08-Flag PE-3 SV-1		

Protein Group 1: Flagellar basal body rod protein FlgG US-Pravencia reagent 32M 131 01-02-000 08-Flag PE-3 SV-1

Proteins in Group

Proteins in Group

N	Unused	Total	Accession	Name	Seq...	Conf	Sequence	Modifications	Chewers	Mass	Protein MW	z	Sc	Spectrum
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	
1	0.00	0.00	104759	Flagellar basal body rod protein FlgG	0.00	0.00	104759	Oxidation(MG2)	0.0000	104759	104759	1	104759	

Figura 23. Análisis de proteínas de la microbiota intestinal del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* por espectrometría de masas “MALDI TOF/ TOF”