

## Aislamiento de bacterias simbiotas del intestino de *Chrysoperla carnea* con actividad proteolítica

A.N. Rodríguez-Arredondo<sup>1</sup>, M. D. Salas-Aráiza<sup>1</sup>, E. Barboza-Corona<sup>1,2</sup> y G. Hernández-Guzmán<sup>1,2</sup>.

**1** Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. [gustavohdz@ugto.mx](mailto:gustavohdz@ugto.mx)

### RESUMEN

Existen insectos benéficos para el control de plagas, como *Chrysoperla carnea* (*C. carnea*) caracterizada por ser un insecto predador. Su importancia radica en la voracidad de las larvas por su presa y la eficiencia para inyectar un conjunto enzimático, disolviendo el contenido interno de su presa succionándolo a través de las mandíbulas que poseen. Se ha observado la posible participación de bacterias en la digestión de las presas, por la relación de simbiote establecida con bacterias, sugiriendo un papel microbiano interesante en la biología de las larvas, sin embargo, no se ha definido a detalle este consorcio bacteriano. Por lo que resulta importante identificar y caracterizar las cepas bacterianas presentes en el intestino de *Chrysoperla* y su contribución a nivel de proteasas requeridas para pre-digerir su alimento. Dicho lo anterior, para el desarrollo de la investigación, se analizará al microbioma intestinal de *C. carnea* se realizará el aislamiento de bacterias a partir de los intestinos de las larvas, empleando medios de cultivo generales y selectivos para estudiar a las bacterias proteolíticas. Se obtuvo 27 cepas bacterianas, caracterizándolas por morfología colonial y microscópica, se identificó a aquellas bacterias productoras de proteasas y se identificaron por análisis molecular del gen 16S rRNA.

**Palabras clave:** Proteasas, bacterias, insecto

### ABSTRACT

*C. carnea* is characterized for being a predatory insect used for pest control, its importance lies in the voracity of the larvae for their prey and the efficiency to inject an enzymatic cocktail, dissolving the internal content of its prey by sucking it through the mandibles. The possible participation of bacteria in the digestion of prey has been observed, due to the relationship of the symbiont established with bacteria, suggests an interesting microbial role in the biology of the larvae, however, these bacteria have not been defined in detail. Therefore, it is important to identify and characterize the bacterial strains present in the gut of *Chrysoperla* and their contribution of proteases required to pre-digest its food. In this research, the gut microbiome of *C. carnea* will be analyzed, using general and selective culture media to study proteolytic bacteria. It was obtained twenty-seven bacterial strains, characterizing them by colonial and microscopic morphology, it was identified proteolytic bacteria also the polymerase chain reaction (PCR) was done by the gene 16S rDNA in order to identify the genus and species of the proteolytic strains

**Keywords:** proteases, bacterium, insect

**Área:** Microbiología y Biotecnología

## INTRODUCCIÓN

*Chrysoperla carnea* Stephens, 1836 (Neuroptera: Chrysopidae) (*C. carnea*) es un insecto que pertenece al orden de Neuróptera distribuido en América, Europa y Asia. Las larvas son depredadoras activas, empleadas principalmente como control biológico. Similar a otros fluidos de insectos, *C. carnea* inyecta un coctel de enzimas digestivas en su presa a través de sus mandíbulas, después de paralizarlo con diversas toxinas, lo que da lugar a la digestión extraoral, antes de succionar el líquido de la presa (Yoshida *et al.*, 2001). Este tipo de digestión incluyen alimentos sólidos y líquidos, involucrándose diversas enzimas, dentro de las cuales se encuentran las proteasas, cuyo fin es desintegrar los tejidos de la presa antes de la ingestión. Sin embargo, por diversos estudios se han encontrado diversas especies bacterianas presentes en el intestino de insectos pertenecientes al orden de Neuróptera, las cuales se encuentran involucrados para ayudar a pre-digerir el alimento, esto debido a un aporte importante de actividad de proteolítica establecido por la relación de simbiosis entre el insecto y las bacterias. Esto sugiere un papel microbiano interesante en la biología de las larvas pertenecientes a este orden, sin embargo, aún se desconoce el aporte de enzimas, principalmente proteasas, derivado de las bacterias presentes en el insecto. Debido a lo anterior, resulta importante caracterizar la comunidad microbiana presente en el intestino de *Chrysoperla*, principalmente a aquellas bacterias productoras de proteasas que puedan tener una contribución para facilitar la digestión del alimento. (Dunn & Stabb, 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se van a emplear larvas de *Chrysoperla carnea* (Stephens) de tercer instar, provenientes del Laboratorio de Entomología, en el Departamento de Agronomía, de la DICIVA y serán alimentadas con huevecillos de palomilla dorada de los granos (*Sitotroga cerealella*).

### Diseción de larvas para aislamiento de bacterias

Los intestinos de *C. carnea* se van a disectar en presencia de agua destilada estéril, bajo dos condiciones: I (1 Intestino) y 5I (5 Intestinos) se van a colocar en tubos Eppendorf agregando 500  $\mu$ L de agua destilada estéril. Finalmente, realizar la molienda del tejido y empelar las siguientes diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000 para cada una de las condiciones, se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso (Díaz & Arteta, 2017). A los intestinos completos de larvas de *C. carnea* se realizará una tinción Gram de fluorescencia para bacterias por el Kit Live Baclight™.

### Aislamiento de bacterias procedentes del intestino de *Chrysoperla carnea*

A partir de la diseción de las larvas y las diluciones obtenidas (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000), se van a colocar cada una de estas en cajas Petri con medio de cultivo para aislar bacterias: Agar de soya tripticaseína, medio Luria Bertani y Agar nutritivo, finalmente se incubarán a 37°C por un periodo de 72 h. A partir de las diluciones donde se observó crecimiento de colonias, se va a realizar la purificación de las cepas individuales por estría cruzada en caja Petri con medio para el crecimiento de bacterias (Agar soya triptocaseína, medio LB y Agar nutritivo) e incubar de 24 a 48 h a 37 °C (Díaz & Arteta, 2017). Posteriormente se va a realizar un análisis de morfología colonial, analizando características como, forma, borde, elevación, textura, color y consistencia de cada uno de los aislados de acuerdo posterior a las 24-48 h de incubación, de igual forma se analizará la morfología microscópica realizando la tinción de Gram.

### Aislamiento de cepas de bacterias con actividad de proteasa

Para el aislamiento de cepas con actividad de proteasa se va a emplear el medio Agar skim milk (Leche en polvo descremada para uso bacteriológico) al 1 y 10% y el medio Agar soya triptocaseína, cada una de las colonias individuales se va a sembrar en cajas Petri con dicho medio y se va a incubar por 3 días a 30°C, la formación de zona clara alrededor de la colonia se consideró como proteasa positiva.

### **Amplificación del gen 16s rRNA en colonia para los aislados de bacterias individuales productores de proteasas y secuenciación del producto de PCR del gen 16S rDNA**

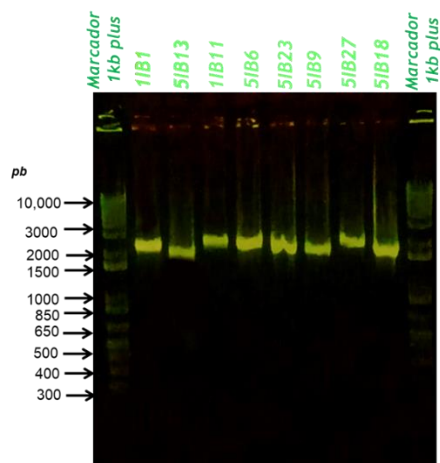
A partir de las colonias individuales productores de proteasas, se va a realizar la PCR con la siguiente mezcla: 22  $\mu$ L de agua destilada, 25  $\mu$ L de DreamTaq Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ L de oligo R (1492R), 1  $\mu$ L de oligo F (27F) y 1  $\mu$ L la cepa bacteriana (Valenzuela, 2018). Una vez obtenido el producto de PCR se procederá a realizar la limpieza del producto de PCR, empleando el Kit DNA clean and concentrator<sup>TM</sup>, ZymoResearch. La amplificación obtenida para cada aislado se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)-CINVESTAV-IRAPUATO, posteriormente se realizó un ensamble de las secuencias en el programa SeqMan<sup>TM</sup>II, para su identificación en la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) y la generación de un reporte de clasificación, posteriormente se obtendrá un árbol filogenético empleando el método de máxima verosimilitud por medio del programa MEGA-X versión 10.0.5.

### **RESULTADO Y DISCUSIÓN**

Se emplearon los medios Agar soya triptocaseína, Medio LB y Agar nutritivo, para aislar bacterias provenientes del intestino de *C. carnea*, realizando siembra con 1 y 5 intestinos, empleado diluciones de 1:10 a 1:100 para 1 intestino y de 1:10 a 1:1000 para 5 intestinos. Se obtuvieron 27 aislados individuales con la siguiente nomenclatura: 1-IB, para aquellas obtenidas a partir de siembras de 1 intestino y 5-IB, para aquellas obtenidas a partir de 5 intestinos. Se observan 6 grupos en base a sus características morfológicas de colonia: plano, liso blanco perla, brillante. Plano, liso blanco mate. Plano, liso amarillo, mate. Plano, liso, rosa, brillante. Plano rugoso, blanco-perla brillante, ondulado. Plano rugoso blanco-perla mate. A cada uno de los aislados bacterianos obtenidos se realizó la técnica de Gram con la finalidad de diferenciar bacterias Gram negativas y Gram positivas, además de observar su forma microscópica para cada aislado, observando lo siguiente. Para los aislados 5-IB23, 1-IB2, 5-IB9 y 5-IB27 se observaron cocos Gram negativos, 5-IB4, 1-IB18, 5-IB11, 1-IB1 y 5-IB6 presento forma de bacilo Gram positivo, los aislados 11-IB3, 5-IB5, 1-IB7, 1-IB8, 5-IB10, 5-IB16, 1-IB17, 5-IB19, 5-IB21 y 5-IB28 fueron cocos Gram positivo, para el caso de 5-IB13, 5-IB14, 5-IB15, 5-IB28, 5-IB24, 5-IB20 y 5-IB26 presentaron forma de bacilo y fueron Gram negativos. Nuestros resultados concuerdan con Nishiwaki *et al.* 2004, pues se observa en larvas del orden de Neuroptera mayor cantidad de bacterias Gram positivas, como es el caso de los aislados analizados.

### **Amplificación del gen 16s rRNA en colonia para los aislados de bacterias individuales**

A partir de los aislados bacterianos obtenidos se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S seleccionando un total de 8 bacterias de acuerdo a sus diferencias fenotípicas y microscópicas observadas: 1-IB1, 5-IB13, 1-IB11, 5-IB6, 5-IB23, 5-IB9, 5-IB27 y 5-IB18, visualizando un amplicón aproximadamente de 1500 pb; **Figura 1** (Valenzuela, 2018). A partir de la amplificación para aislado, se envió secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)-CINVESTAV-IRAPUATO, para la identificación a nivel de género y especie.



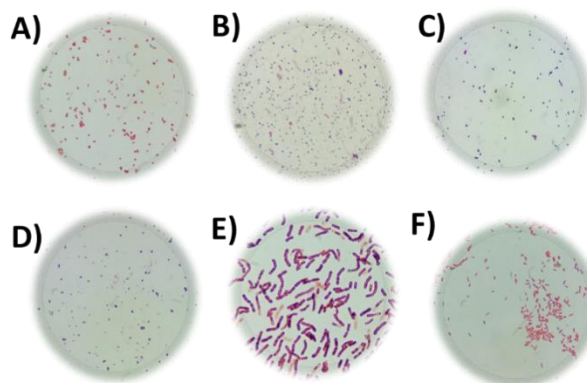
**Figura 1** Amplificación del gen rRNA 16S a partir aislados bacterianos obtenidos del intestino de *Chrysoperla carnea*.

### **Análisis taxonómico y fenotípico para los aislados bacterianos**

En la **Tabla I**, se muestra la taxonomía para cada aislado junto con su porcentaje de identidad y el número de acceso obtenido por medio de *Ribosomal Database Project (RDP)*, cada uno identificado con un porcentaje de identidad mayor al 99%, observando 3 filos predominantes: Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes. En cuanto a las características fenotípicas se ha reportado que los géneros de *Micrococcus* son colonias lisas, con borde entero, caracterizadas por presentar una coloración amarilla cuando crecen en medio Agar soya triptocaseína. En el caso de *Serratia marcescens*, caracterizada por presentar una coloración rosa al crecer en diversos medios, una apariencia opaca. Para *Enterococcus faecalis*, caracterizada por presentar borde entero, son colonias lisas y circulares, además de presentar un color blanco al crecer en medio Agar sólido. *Acinetobacter schindleri*, por su parte presenta bordes enteros, lisas y una coloración blanca. *Bacillus arayabattai*, presentan una apariencia brillante, borde entero, lisa y una coloración blanca en medio Agar. En cuanto al origen bacteriano de los aislados, la bacteria *Micrococcus yunannensis* y *Serratia marcescens* se ha observado en el tracto digestivo en insectos como es el caso de *E. foetida*, sin embargo, no ha sido estudiado su participación en éste. Además, *Serratia* junto con *Micrococcus luteus* han sido identificados en muestras de suelo, animales y agua. Otros géneros como *Acinetobacter* y *Bacillus arayabattai*, son principalmente patógenos oportunistas en humanos (Grimont & Grimont, 2015), (Zhao *et al.*, 2009), (Schleifer & Kilpper-balz, 2015), (Dortet *et al.*, 2006), (Elarabi *et al.*, 2020). Las características microscópicas para cada aislado se observan en la **Figura 2**, observando que los géneros de *Micrococcus* y *Enterococcus faecalis*, presentan una tinción Gram positiva y forma de cocos. *Bacillus arayabattai* presenta tinción Gram positiva con forma de bacilo. La bacteria *Serratia marcescens* presenta una tinción Gram negativa con forma de bacilo y finalmente, en cuanto a *Acinetobacter schindleri* presenta una tinción Gram negativa y forma de cocos (Dortet *et al.*, 2006), (Elarabi *et al.*, 2020).

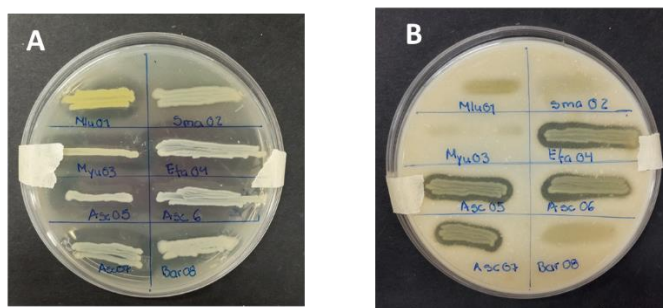
**Tabla I.** Identificación molecular de aislados bacterianos del intestino de *C. carnea*

Bacteria	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie <sup>1</sup>
I-IB1	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i> Acceso: AF234843 99%
5-IB13	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Yersiniaceae	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> Acceso: AB061685 100%
1-IB11	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>M. Yunannensis</i> Acceso: JQ040010 99%
5-IB6	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> Acceso: AB012212 100%
5-IB23	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. Schindleri</i> Acceso: AJ278311 99%
5-IB9	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. Schindleri</i> Acceso: AJ278311 99%
5-IB27	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. Schindleri</i> Acceso: AJ278311 99%
5-IB18	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. aryabhatai</i> Acceso: HM209759 99%



**Figura 2** Tinción Gram para los aislados. A) *Acinetobacter 42chindler* B) *Micrococcus luteus* C) *Micrococcus yunannensis* D) *Enterococcus faecalis* E) *Bacillus aryabhatai* F) *Serratia marcescens*

En cuanto al análisis de actividad proteolítica de cada aislado bacteriano identificado a partir del intestino de *C. carnea*, (Mlu01, Sma02, Muy03, Efa04, Asc05, Asc06, Asc07 y Bar08), se observó un aclaramiento para todas las cepas en el medio de agar soya triptocaseína y leche descremada al 1 y 10% a las 2. Este aclaramiento es generado por la acción de proteasas que son secretadas al medio y por consecuencia la degradación de la proteína presente en la leche (caseína), encargada de conferir el color blanco a la leche, cuando esta proteína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento bacteriano (**Figura 3**). Estos resultados sugieren la posible aplicación de proteasas en la industria alimentaria, obtenidas a partir de los aislados bacterianos del intestino de *C. carnea*, dando lugar a un campo de estudio evaluando la aplicación no solo en la producción de alimentos, sino en las mejoras de los procesos de fabricación y las propiedades sensoriales de los alimentos



**Figura 3** Medio agar soya triptecaseína y leche descremada a 24 de incubación. Degradación de la caseína observada por aclaramiento alrededor del crecimiento de la bacteria. A) Leche descremada al 1%, B) Leche descremada al 10%.

## BIBLIOGRAFÍA

- Díaz, R. P., & Arteta, L. C. V. (2017). Identificación de larvas productoras de miasis obtenidas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca con importancia en salud pública. *NOVA*, 15(28), 79-91.
- Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C. J., & Cattoir, V. (2006). Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4471-4478.
- Dunn, AK & Stabb, EV (2005). Caracterización independiente del cultivo de la microbiota de la hormiga león *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Microbiología aplicada y ambiental*, 71 (12), 8784-8794.
- Elarabi, N. I., Abdelhadi, A. A., Ahmed, R. H., Saleh, I., Arif, I. A., Osman, G., & Ahmed, D. S. (2020). *Bacillus aryabhatai* FACU: A promising bacterial strain capable of manipulate the glyphosate herbicide residues. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2207-2214.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. (2015). *Serratia*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-22.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. (2015). *Serratia*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-22.
- Nishiwaki, H., Ito, K., Otsuki, K., Yamamoto, H., Komai, K., & Matsuda, K. (2004). Purification and functional characterization of insecticidal sphingomyelinase C produced by *Bacillus cereus*. *European journal of biochemistry*, 271(3), 601-606
- Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., ... & Matsuda, K. (2001). La chaperonina se convirtió en toxina de insectos. *Nature*, 411 (6833), 44-44.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313.
- Zhao, G. Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y. Q., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., ... & Li, W. J. (2009). *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillarum* roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(10), 2383-2387.