



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL QUÍMICO-
ECOLÓGICO RESIDENTES DEL APARATO REPRODUCTOR DE HEMBRAS Y
MACHOS DE *Cyclocephala lunulata* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE)**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**PRESENTA:
ABRAHAM SÁNCHEZ CRUZ**

DIRECTOR: ANGEL ALONSO ROMERO LÓPEZ

CO-DIRECTOR: MARÍA ROSETE ENRÍQUEZ

Junio 2017

Agradecimientos

Antes que nada quiero agradecer a la BUAP por toda la formación académica que se me fue brindada, así como el uso de instalaciones y equipo para la realización de este trabajo, al comité revisor por su tiempo y el honor de poder evaluar el presente trabajo.

Al profesor Angel Alonso Romero López primeramente por la oportunidad de realizar la tesis en su área de estudio, toda la enseñanza, paciencia y apoyo tanto académico como personal, y por ayudarme a descubrir que uno puede ir superando sus límites. A la profesora María Rosete Enríquez por aceptarme en su laboratorio, toda la enseñanza no solo en técnicas de trabajo, sino también en valores como disciplina y responsabilidad, gracias por todo. A todos mis profesores de la universidad por toda la enseñanza a lo largo de toda la carrera, a todos mis amigos cuyos nombres no pongo no por falta de afecto, sino porque no cabrían los de todos diciendo tantas cosas positivas que me han aportado cada uno.

A mis familiares por ambas partes por todo el apoyo que me han mostrado a lo largo de mi vida y resaltando la admiración que tengo a cada uno de ustedes ejemplo de trabajo y constancia que siempre hace que vallan adelante, a mis abuelos las cuatro estrellas que iluminan ya en el cielo y cuyo resplandor no desaparece en el día, muchas gracias por todos esos momentos, enseñanzas y cuidados así como contentillos, aparte a ustedes el agradecimiento es doble no solo por lo mencionado anteriormente sino también por los padres que me dieron.

A mis padres y hermana por todo lo que me han dado, por toda la ayuda enseñanza, cuidados y tantas y tantas cosas que no encuentro otra palabra para definirla más que amor. Mi Padre ejemplo de trabajo y lucha, así como la paciencia y muchas gracias “Carnal” espero algún día poder devolverte todo lo que me has dado. A mi madre por el amor y cuidados, aunque nuestros caracteres choquen siempre me ha apoyado en mis metas y mis sueños, a mi hermana por todo lo compartido y su apoyo.

A Yeni por todo el apoyo y amor, sin ti no hubiera podido llegar hasta aquí. Todo lo que hemos pasado y lo que hemos afrontado gracias por acompañarme en mis peores momentos e inspirarme a superarme así como no dejarme rendirme Te amo.

A Dios por dejarnos poder estudiar las maravillas de su creación.

Índice de Figuras y Cuadros

Descripción	Página
Figura 1. Esquema de un macho de <i>Cyclocephala lunulata</i> , mostrando algunos de sus caracteres morfológicos diagnósticos.	8
Figura 2. Morfología del aparato reproductor de hembra y macho de <i>Macroductylus mexicanus</i> . Figura 1.	10
Cuadro 1. Cuadro de condiciones para amplificar PCR.	20
Figura 3. Bacterias extraídas de la cámara genital de hembras de <i>Cyclocephala lunulata</i> cultivadas en medio LB.	24
Figura 4. Bacterias extraídas de la capsula genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> , cultivadas en medio LB.	25
Cuadro 2. Tabla de características morfológicas.	26
Figura 5. Colonias aisladas por dilución limitante encontradas en la cámara genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> .	27
Figura 6. Morfología bacteriana de las colonias extraídas de la cámara genital y la cápsula genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> .	28
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de PCR del gen ARNr 16S.	29
Figura 8. Electroferogramas y secuencias del gen ARNr 16S de bacterias aisladas de la cámara genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> .	30
Figura 9. Cultivos de bacterias extraídas de la cámara y cápsula genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> en medios selectivos.	33
Figura 10. Bacterias obtenidas en la cápsula y cámara genital de <i>Cyclocephala lunulata</i> sembradas en gar Citrato de Simmons y agar Hierro triple azúcar.	34
Figura 11. Colonias de <i>Klebsiella oxytoca</i> sembradas en medio Eosina azul de metileno.	35
Cuadro 3. Resultado API 20e.	37
Figura 11. Medios selectivos de las bacterias obtenidas del intestino de hembras y machos de <i>Cyclocephala lunulata</i> .	39

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
µM	Microméetro
µl	Microlitros
A	Adenina
A.P.H.A	Asociación Americana de la Salud Pública (<i>Amerycan Public Health Association</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
API 20e	Índice analítico de perfil (<i>Analytical Profile Index</i>), 20 referido a las 20 pruebas bioquímicas de la familia Enterobacteriaceae.
ARNr 16s	Ácido ribonucleico ribosomal de la sección 16
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineación básica (<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>)
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
C	Citosina
Com. Pers.	Comunicación personal (<i>Comunication Personnelle</i>)
dNTP	Desoxirribonucleicos trifosfato
G	Guanina
Hrs	Horas
L	Litro
LB	Luria Bertani.
Min	Minutos
MI	Mililitros
Mm	Milímetros
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetros
PB	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PH	Potencial de hidrogeno
S	Segundos
T	Tiamina
TAE	Tris, Ácido Acético y EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM	Universidad Autónoma de México
UV	Ultravioleta
V	Volteos

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	4
2.1. Relaciones Microorganismos-Insecto.....	4
2.2. Identificación taxonómica de microorganismos por pruebas moleculares y bioquímicas.....	5
2.3. Generalidades sobre Melolonthidae y el género <i>Cyclocephala</i>	6
2.4. Comunicación química sexual en melolontidos y en integrantes de <i>Cyclocephala</i>	8
2.4.1. Emisor.....	9
2.4.2. Mensaje.....	11
2.4.3. Receptor.....	12
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos particulares.....	16
6. Material y métodos.....	17
6.1. Disección de aparatos reproductores y cultivo de microorganismos.....	17
6.2. Estudios de identificación por ARNr 16S.....	18
6.3. Pruebas microbiológicas: cultivos en medios selectivos.....	20
6.4. Pruebas bioquímicas.....	21
7. Resultados.....	23
7.1. Bacterias de la cámara genital de hembras de <i>C. lunulata</i> cultivadas en medio LB sólido.....	23
7.2. Bacterias de la cápsula genital de machos de <i>C. lunulata</i> cultivadas en medio LB sólido.....	24
7.3. Descripción morfológica de las bacterias encontradas en la cámara genital de hembras y machos de <i>C. lunulata</i>	25

7.4. Identificación por taxonomía molecular de las bacterias aisladas de la cámara genital de hembras de <i>C. lunulata</i>	28
7.5. Caracterización de condiciones de crecimiento en medios selectivos.....	31
7.6. Pruebas bioquímicas.....	35
7.7. Bacterias del Intestino de hembras y machos de <i>C. lunulata</i>	38
7.7.1 Medios selectivos para bacterias del intestino de hembras y machos de <i>C. lunulata</i>	38
8. Discusión.....	40
8.1 Identificación taxonómica de bacterias.....	40
8.2. Bacterias extraídas del intestino de machos y hembras de <i>C. lunulata</i>	46
8.3 Potencial químico ecológico de las bacterias identificadas en aparatos reproductores de <i>C. lunulata</i>	47
9. Conclusiones.....	51
10. Literatura citada.....	52
11. Anexos.....	63

Resumen

Existen dos reportes previos de microorganismos que residen en las estructuras reproductivas de hembras de dos especies de Melolonthidae (Coleoptera): *Costelytra zealandica* W. (Hoyt *et al.*, 1971) y *Phyllophaga ravidia* B. (Pérez-Estrada, 2016). En ambos casos se menciona que los organismos identificados pueden tener una posible participación en la producción de atrayentes sexuales. En el presente trabajo se aislaron e identificaron bacterias con potencial químico-ecológico del aparato reproductor de adultos de *Cyclocephala lunulata* B., una especie de Melolonthidae con distribución en México y considerado con importancia ecológica (Morón *et al.*, 1997).

Se efectuó una disección del aparato reproductor de hembras y machos de *C. lunulata*, sembrando muestras del interior en medio Luria Bertani (LB). Una vez obtenidas las bacterias de estas muestras, se procedió a la identificación molecular por medio del gen ARNr 16S. También se efectuaron pruebas en seis medios selectivos. Aunado a esto se aplicaron 21 pruebas bioquímicas mediante la galería API 20e y una prueba de oxidasa. Además se extrajeron muestras del intestino como control a las cuales se les realizaron pruebas en los seis medios selectivos. Se obtuvieron tres colonias bacterianas de las muestras de la cámara genital de las hembras y una colonia de la cápsula genital de los machos. En las muestras de las demás estructuras no hubo ningún tipo de crecimiento. Mediante la técnica del ARNr16s se identificaron dos de las tres colonias aisladas en la cámara genital: *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii*. Las otras dos colonias fueron nombradas como CamGeBI3♀ para la colonia de la cámara genital y Capgen♂ para la de la cápsula genital de machos. *Klebsiella oxytoca* presentó crecimiento en todos los medios selectivos al igual que *C. freundii*. En contraste, CamGeBI3♀ y Capgen♂ no crecieron en la mayoría de los medios selectivos. En las pruebas bioquímicas, *K. oxytoca* y *C. freundii* presentaron resultados positivos en la mayoría de las pruebas, mientras que las bacterias CamGeBI3♀ y Capgen♂ mostraron un resultado negativo en la mayoría de estas. Por lo anterior, las colonias bacterianas aisladas de la cámara genital de hembras de *C. lunulata* podrían estar involucradas en la producción de atrayentes sexuales de esta especie.

1. Introducción

La reproducción y sus mecanismos de regulación son de los principales procesos que impactan directamente en la adecuación de los insectos. Esto no es la excepción en los coleópteros que forman parte de la familia Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), más aún si la atención se centra en las fases previas a su contacto sexual. A pesar de la abundancia y riqueza de estos escarabajos, aún se desconoce gran parte de la información sobre su biología y los aspectos relacionados con su actividad sexual y reproducción (Romero-López, 2012). En este sentido, la información sobre la morfología del aparato reproductor de los adultos de este grupo resulta fundamental para localizar el sitio de producción de los atrayentes y feromonas sexuales, los cuales son “infoquímicos” que median sus interacciones intraespecíficas (Dicke y Sabelis, 1988). El estudio de dichas sustancias y las interacciones relacionadas con éstas es la razón de ser de la Ecología química, la cual ha surgido como área de interés para los melolóntidos desde hace algunos años (Leal, 1998; Romero-López *et al.*, 2005). En general, para estos coleópteros se cuenta con información sobre su esquema de comunicación química sexual, en el cual las hembras son las encargadas del “llamado”, lo que involucra una serie de movimientos y actos que concluyen con la exposición de la cámara genital protráctil y la potencial liberación de infoquímicos que provocan la atracción de los machos con fines de apareamiento (Romero-López *et al.*, 2010). Existe ya un avance sustancial en el estudio de los tres principales elementos que conforman al esquema y esto ha permitido enfocar la atención en detalles de cada uno de ellos. Este es el caso del “emisor”, para el cual, además de la localización de epitelios especializados en la producción de atrayentes y feromonas sexuales (Romero-López *et al.*, 2011; Benítez-Herrera *et al.*, 2015), el interés se ha dirigido a la búsqueda de otros sitios de producción, como es el caso de aquellos en donde existen microorganismos asociados a estructuras reproductoras de las hembras o incluso, hacia la posible participación de los machos en la producción de atrayentes de agregación (Leal, 1998).

Por lo anterior, en el presente estudio se plantea el identificar taxonómicamente a los microorganismos con potencial para producir infoquímicos y localizarlos en

zonas específicas del aparato reproductor tanto de hembras como de machos de *Cyclocephala lunulata* B. Además del aporte teórico que se pretende brindar, se espera sentar las bases para la futura implementación de un programa de manejo de esta especie, basado en el uso de atrayentes sexuales y/o de agregación.

2. Antecedentes

2.1. Relaciones microorganismos-insectos

Desde hace tiempo se ha estudiado la relación de microorganismos con otras especies, pudiéndose registrar que las bacterias se asocian con diferentes especies de la clase Insecta (Buchner 1965, Campbell 1990). Muchos insectos contienen a una comunidad de microorganismos muy rica, diversa y compleja de que participan activamente en su vida mediante varios tipos de relación (Dillon y Dillon 2004; McCutcheon 2009). Se ha registrado que la microflora intestinal de la abeja melífera *Apis mellifera* L. es catalogada como benéfica (Wu *et al.*, 2012); el tracto gastrointestinal de las abejas melíferas es un ecosistema complejo que alberga una diversidad de comunidades microbianas que participan activamente en procesos digestivos (Gilliam 1997, Martinson *et al.*, 2011). También se han reportado casos en los que cuando la dieta de los insectos es deficiente; estos poseen microorganismos simbióticos que proporcionan nutrientes específicos en el suministro dietético (Douglas, 2009); Como en el caso particular de insectos que se alimentan de savia de plantas, se ha revelado que sus microorganismos proporcionan aminoácidos esenciales que no se encuentran en su dieta (Douglas, 2011). El mismo autor cita que en el caso de las conocidas como “moscas tsé-tsé” o “moscas del sueño” (*Glossina* spp.), se sabe que los adultos poseen microorganismos intestinales simbióticos que le ayudan a sintetizar vitamina B y derivados, lo cual es escaso en su dieta. Se han registrado comunidades bacterianas benéficas en el intestino de *Meimuna mongolica* D. (Zhou *et al.*, 2015) y enterobacterias simbióticas en el intestino de *Thrips tabaci* L., las cuales pueden participar en procesos digestivos (De Vries *et al.*, 2004). De manera similar se ha demostrado que bacterias del género *Enterobacter* tienen un papel en la nutrición de los insectos, como es el caso de la fijación de nitrógeno en *Bactrocera tryoni* F. (Murphy *et al.*, 1994).

Pero los beneficios no son solo en cuestiones nutricionales. Algunas bacterias del género *Pseudomonas* pueden desempeñar actividad antagonista hacia los hongos entomopatógenos en la polilla de dorso diamante *Plutella xylostella* L. (Indiragandhi *et al.*, 2007), entre otras funciones de defensa como la prevención del

establecimiento de parásitos en el intestino medio de mosquitos (Azambuja *et al.*, 2005) o la desintoxicación en los escarabajos de *Paederus* (Piel, 2002). Los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* que se encuentran en el intestino de *Meimuna mongolica* D. posiblemente juegan diferentes roles como nutrición, desarrollo y supervivencia.

En cuanto a coleópteros, algunos estudios han revelado que diversas comunidades y linajes microbianos son típicamente encontrados en el tracto intestinal de las larvas de *Dermolepida albohirtum* W. (Pittman *et al.*, 2008; Andert *et al.*, 2010). De igual forma, los “descortezadores” *Dendroctonus rhizophagus* T. tienen una variedad de microorganismos simbioses en el intestino capaces de producir compuestos que son utilizados por su hésped como infoquímicos (Hunt y Borden, 1990). Resultan escasos los estudios sobre microorganismos productores de atrayentes y feromonas asociados a insectos. Se sabe que algunos integrantes de la clase Insecta poseen feromonas de agregación que son liberadas por o en asociación con bacterias (Tillman *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2005). El hongo mutualista *Grosmannia clavigera* R. produce esteroides que son necesarios para la biosíntesis de feromonas de agregación utilizadas por *Dendroctonus ponderosae* H. (Blomquist *et al.*, 2010).

2.2. Identificación taxonómica de microorganismos por pruebas moleculares y bioquímicas

Actualmente las técnicas moleculares son herramientas muy usadas para la clasificación taxonómica de microorganismos, las cuales muchas veces respaldan y apoyan a otras técnicas de mayor tiempo de uso como lo son las pruebas bioquímicas. Hablando de las pruebas moleculares específicamente en el caso de bacterias asociadas a insectos, la amplificación del gen del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S) es una herramienta accesible para una identificación confiable de las procariontes (Marçon *et al.*, 2012). Esta técnica es utilizada ampliamente para estudiar la diversidad microbiana en sitios específicos de diferentes organismos. El análisis molecular por medio del gen ARNr 16S reveló que la mayoría de las bacterias aisladas en el intestino de las abejas melíferas

pertenecen al género *Bacillus* (Wu *et al.*, 2014). Gracias a esta técnica se ha logrado conocer que la microbiota intestinal de los insectos varía ampliamente entre diferentes taxones, incluyendo Proteobacteria, Firmicutes y Protistas (Brugerolle y Radek, 2006; Morales-Jimenez *et al.*, 2009). La identificación taxonómica utilizando la secuencia del ARN 16s reveló que el intestino de la mayoría de los insectos tiene <20-30 taxones (Dillon y Dillon, 2004; Robinson *et al.*, 2010). En un caso más específico para coleópteros, esta técnica ha servido para identificar la diversidad microbiana del intestino de *Dastarcus helophoroides* F. (Zhang *et al.*, 2012).

Por otra parte, la identificación taxonómica de bacterias por pruebas tradicionales bioquímicas sigue siendo de gran ayuda para comparar y respaldar resultados de pruebas moleculares (De Vries *et al.*, 2008). Wu y colaboradores (2012) propone la utilización de técnicas más tradicionales como las pruebas bioquímicas para un respaldo de las pruebas moleculares. Taochan y colaboradores en el 2010 utilizan pruebas bioquímicas, en específico la prueba API 20e, para comparar sus resultados de identificación molecular por el gen ARN 16s de bacterias colectadas en el intestino de *Bactrocera cacuminata* H. y *Bactrocera tryoni* F., obteniendo una diversidad parecida por ambos métodos. En otro estudio Simmons y colaboradores en el 2014 comprueban que la prueba bioquímica API 20e tiene un índice de similitud del 89% que las pruebas moleculares para la identificación de *Escherichia fergusonii* F. En el caso específico de *Salmonella enterica* L. tanto pruebas moleculares como bioquímicas (API 20e) tuvieron una efectividad del 99.9% para la correcta identificación de esta bacteria (Nucera *et al.*, 2006). La prueba API 20e ha sido utilizada desde hace mucho tiempo por sus resultados positivos para la identificación de diversas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* lo que la hace una prueba confiable con una amplia trayectoria en su utilización lo cita Peele y colaboradores (1997) para la identificación de bacterias Gram negativas residentes en humanos y animales.

2.3. Generalidades sobre Melolonthidae y el género *Cyclocephala*

Los integrantes de la familia Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), conocidos también como “moyotes”, “escarabajos de junio” o “melolóntidos”, conforman a un

grupo de coleópteros que en su etapa adulta presentan colores diversos y vestidura variada; el tamaño corporal varía entre 3 y 170 mm; tienen mandíbulas bien desarrolladas, esclerosadas, con dientes en el borde interno, más o menos ocultas bajo el clípeo. Los tarsos son pentámeros en los tres pares de patas, uñas tarsales bien desarrolladas, con formas diversas: simples, dentadas, bífidas, usualmente móviles y en pares. Los élitros siempre están desarrollados, en ocasiones fusionados entre sí y las alas metatorácicas usualmente bien desarrolladas, en pocos casos reducidas o ausentes. Exhiben con frecuencia dimorfismo sexual: los machos pueden presentar proyecciones en la cabeza y el pronoto con forma de cuernos o protuberancias con diseños muy diversos (Morón, 1997). El mismo autor cita que se alimentan con tejidos, secreciones o restos vegetales y las larvas comúnmente son fitosaprófagas, rizófagas o xilófagas. Esta forma de agrupamiento, caracterizada por los hábitos alimentarios fitófagos o fitosaprófagos, ha sido aceptada históricamente y confirmada en varios estudios (Scholtz y Chown 1995; Jameson y Ratcliffe 2002, Smith *et al.*, 2006, Hunt *et al.*, 2007, Lawrence *et al.*, 2011).

Entre los géneros que forman parte de esta familia, se encuentra *Cyclocephala* Burmeister, 1847. Los adultos de este género (Figura 1) se caracterizan por contar frente oscurecida, antenas con maza similar en longitud a los segmentos II al VII juntos, tibia anterior con el diente basal ligeramente separado con respecto a los otros y élitros con margen sutural simple (Neita *et al.*, 2006). Las larvas son de tipo escarabaeiforme (Morón, 1993; 1997) consideradas como saprófagas e incluso se descartan los múltiples señalamientos que la destacan como plaga rizófaga. Sin embargo, cabe replantear la condición de plaga de los adultos, ya que éstos pueden ejercer un papel como plagas estacionales en frutales en guayaba y otras frutas con corteza blanda, pues no se ha confirmado como plaga en otros cultivos (Stechauner *et al.*, 2010). Los integrantes de este género emergen del suelo como adultos durante épocas lluviosas, inicialmente en abril y mayo. La mayor frecuencia de cópulas se observa durante la primera semana después de la emergencia, en los sitios a los cuales son atraídos los adultos. La cópula dura entre 15 y 20 min, aunque en algunos casos puede extenderse más; después de ocurrida, simplemente se

separan y la hembra sigue sobre el sustrato alimenticio o se sumerge en el suelo (Stechauner *et al.*, 2010). Los adultos son poco longevos (25-30 días), en especial los machos, los cuales sobreviven menos de 25 días en promedio (Stechauner *et al.*, 2010).

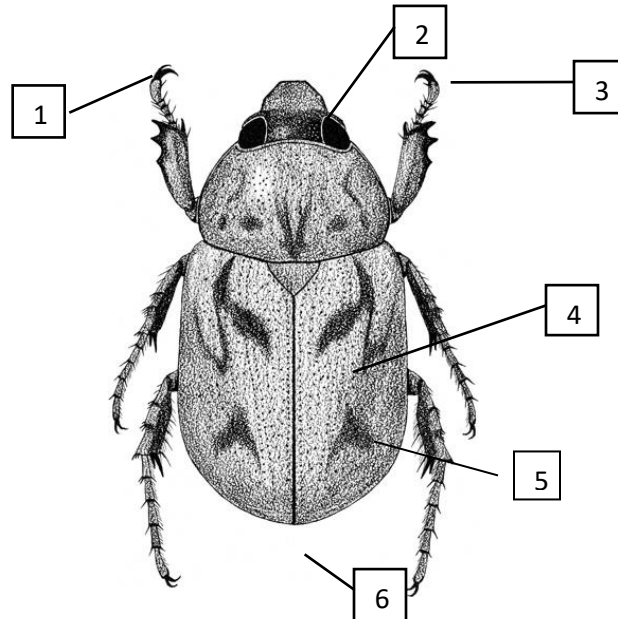


Figura 1. Esquema de un macho de *Cyclocephala lunulata*, mostrando algunos de sus caracteres morfológicos diagnósticos. 1.- Primer par de patas donde la uña tarsal es de mayor tamaño que la de las hembras. 2.- Frente oscurecida. 3.- Tarsos en forma de pentámeros en los tres pares de patas. 4.- Élitros bien desarrollados 5.- Élitros con cuatro o mas manchas simétricas . 6.-Pigidio con sedas pequeñas. Tomado de Endrödi, 1985.

2.4. Comunicación química sexual en melolóntidos y en integrantes de *Cyclocephala*

La Ecología química se ha definido como el área de estudio que se enfoca en la comprensión ecológica del origen, la función y la importancia de los productos químicos naturales que median las interacciones dentro y entre organismos (Harborne, 2001). Estos productos también son denominados también como infoquímicos, los cuales son compuestos que, dentro de un contexto natural, transmiten información entre individuos, produciendo en el receptor una respuesta de comportamiento o fisiológica (Dicke y Sabelis, 1988).

Los melolóntidos presentan un esquema de comunicación química sexual (Romero-López *et al.*, 2010) que se centra en el estudio de tres elementos principales: “emisor”, “mensaje químico” y “receptor”. Para obtener esta información, es necesario el estudio del comportamiento precopulatorio de la especie bajo estudio.

Con base en esto se ha encontrado que en estos insectos se presenta el denominado “llamado sexual”, un patrón de comportamiento que consiste en una serie de actos, movimientos y posturas consecutivas por parte de las hembras, que culmina con la exposición de la cámara genital; se sugiere que en este preciso momento los infoquímicos que atraen a los machos para el acercamiento y el contacto sexual son liberados (Romero-López *et al.*, 2010a). El estudio del “emisor” ha permitido la obtención de evidencias morfológicas que confirman la existencia de sitios productores de atrayentes o feromonas sexuales en hembras de los géneros *Anomala* Samouelle y *Holotrichia* H. (Tada y Leal, 1997; Leal, 1998; Kim y Leal, 1999). En especies de *Anomala* se ha encontrado que la producción de los atrayentes y feromonas sexuales se lleva a cabo en células epiteliales localizadas en la placa anal y los esternitos pigidiales de las hembras, así como a través de poros cuticulares (Tada y Leal, 1997). En contraste, en especies de *Holotrichia* se ha observado que en la sección posterior de la cámara genital hay células Clase I, relacionadas con la producción y secreción de feromonas en insectos (Kim y Leal, 1999). Otros trabajos se han enfocado en el “mensaje químico”, encontrándose que las feromonas sexuales de estos insectos se componen principalmente de derivados de aminoácidos, fenólicos, de ácidos grasos e isoprenoides (Leal, 1998; Tillman *et al.*, 1999; Anaya *et al.*, 2001; Zarbin *et al.*, 2007) y en el “receptor”, reportándose que los quimiorreceptores localizados en las lamelas antenales son el principal sitio de captación de las feromonas (Leal, 1998; Ochieng *et al.*, 2002; Romero-López *et al.*, 2010b).

2.4.1. Emisor

En general, se sabe que mientras las hembras de Melolonthidae emergen, los machos vuelan buscando un punto elevado en donde posarse para rastrear a su compañera potencial (King, 1984; Morón, 1986; Morón *et al.*, 1996). Cuando la hembra emerge del suelo, lleva a cabo el “llamado sexual”, el cual está relacionado con la liberación de feromonas sexuales y/o atrayentes sexuales. Este comportamiento se ha sugerido también para *Cyclocephala immaculata* O. y *Cyclocephala borealis* A. (Potter, 1980).

Además de obtener más información acerca del comportamiento precopulatorio de los melolóntidos, es importante también conocer los aspectos fisiológicos y reproductivos del modelo biológico bajo estudio, como ya se ha logrado realizar con especies distribuidas en México. Este es el caso de las hembras de *Phyllophaga opaca* M. (Romero-López *et al.*, 2010b) y *Phyllophaga obsoleta* B. (Romero-López *et al.*, 2011), para ambas especies se han obtenido resultados que permiten relacionar la morfología de la cámara genital y las glándulas accesorias con la producción de atrayentes sexuales (Figura 2). De igual forma, el aparato reproductor de hembras y machos de *Macroductylus mexicanus* B. (Figura 2) ha sido estudiado y el de las primeras se asocia con la producción de sustancias de este tipo. Además de todas estas investigaciones, también se ha vinculado la producción de atrayentes con la actividad de microorganismos residentes en alguna estructura del sistema reproductor de estos insectos, como se ha documentado para *Costelytra zealandica* W. (Hoyt *et al.*, 1971), *Phyllophaga ravidia* B. (Pérez-Estrada, 2016) y *Macroductylus nigripes* B. (Trujillo-Vélez, 2017).

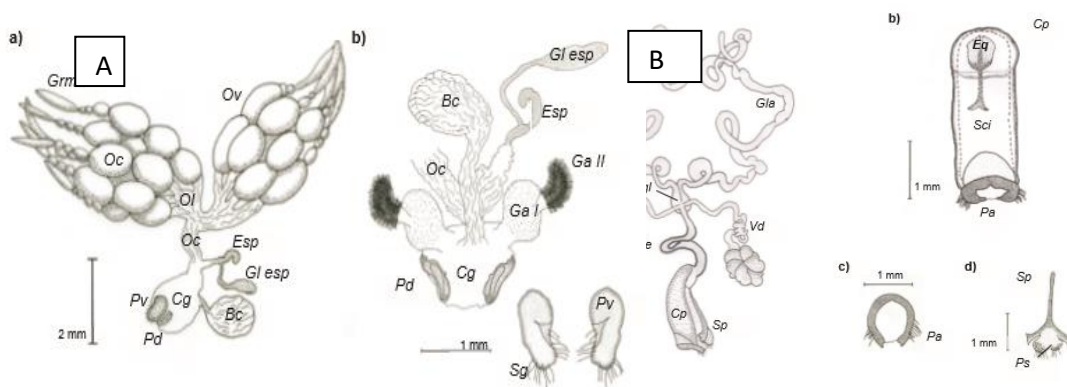


Figura 2. Morfología del aparato reproductor de hembra y macho de *Macroductylus mexicanus*. A.- a) Esquema general, vista dorsal. b) Vista dorsal de la cápsula genital. c) Vista frontal de los parámetros. d) Vista ventral del spiculum gastrale. (Cp Cápsula genital, De Conducto eyaculador, Eq Estructura quitinizada, Gla Glándula accesoria, Rgl Reservorio glandular, Vd Vaso deferente, Pa Parámetros, Ps Placas asociadas, Sci Saco interno, Sp Spiculum gastrale, Testículo). a) Esquema general, vista lateral. b) Vista dorsal. (Bc Bursa copulatrix, Cg Cámara genital, Esp Espermateca, Ga I Glándula accesoria tipo I, Ga II Glándula accesoria tipo II, Gl esp Glándula de la espermateca, Grm Germario, Oc Oocito, Ov Ovario, Oc Oviducto común, Ol Oviducto lateral, Pd Placa genital dorsal, Pv Placa genitalventral, Sg Sedas genitales). Tomado de Benítez-Herrera *et al.*, 2015.

2.4.2. Mensaje

En un esquema de comunicación química, el mensaje puede presentarse en forma de atrayentes, feromonas o cualquier tipo de infoquímico que involucra la transmisión de información en un contexto químico-ecológico. En particular, las feromonas sexuales son mezclas de sustancias emitidas por un individuo de un sexo, con el objetivo de atraer a otro u otros miembros del sexo opuesto y así lograr el apareamiento (Ward *et al.*, 2002). Para los melolóntidos, se ha documentado la existencia de feromonas sexuales en la interacción entre hembras y machos de cada una de las subfamilias Cetoniinae L. (Domek *et al.*, 1988), Melolonthinae L. (Yarden *et al.*, 1994), Dynastinae M. (Potter *et al.*, 1980) y Rutelinae M. (Leal *et al.*, 1992). Para los integrantes de la subfamilia Melolonthinae se ha descrito que sus feromonas sexuales son derivados de ácidos grasos, aunque llegan a presentarse casos excepcionales en donde las hembras producen alcaloides que presentan propiedades medicinales (Leal *et al.*, 1997). Se ha logrado la identificación de los principales componentes feromonales de integrantes de los géneros *Anomala* Casey, *Melolontha* F. y *Phyllophaga* H. e incluso se han llevado a cabo pruebas en campo que validan el uso de estas sustancias para el manejo de especies plaga (Romero-López y Arzuffi, 2010). En el caso de *Cyclocephala*, se cuenta con reportes aislados sobre una posible feromona sexual identificada en hembras de *Cyclocephala lurida* B. (Potter, 1980) y sobre atrayentes sexuales para *C. immaculata* y *C. borealis* (Potter, 1980).

Por otro lado, las feromonas de agregación son infoquímicos involucrados en la atracción de individuos de la misma especie y pueden ser del mismo o distinto sexo. Para los integrantes de la subfamilia Dynastinae (al cual pertenece *Cyclocephala*), se ha documentado la identificación de feromonas de agregación (Leal, 1998; 1999). Un éster etílico ha sido identificado como parte de la feromona de agregación para escarabajos del género *Oryctes* I. La base de la misma feromona es utilizado por dos especies aisladas geográficamente: *Oryctes monoceros* O. que es una de las plagas más destructivas de coco comercial, el aceite y palmeras en África y *Oryctes rhinoceros* L., que es uno de las plagas más importantes de las palmas de coco y el aceite en el sur y sudeste de Asia (Hallet *et al.*, 1995).

2.4.3. Receptor

Existen reportes para varias especies de melolóntidos donde se resalta que los machos poseen estructuras específicas en sus antenas para captar los mensajes químicos en el ambiente, las cuales son de gran utilidad para la comunicación química sexual (Romero-López, 2016). Se ha propuesto una clasificación en la que pueden identificarse hasta seis tipos de quimiorreceptores antenales en diferentes especies de la subfamilia Hopliinae (Romero-López *et al.*, 2013) y de *Phyllophaga* (Romero *et al.*, 2004, 2010c; Romero-López y Benítez-Herrera 2014).

Se han identificado diferentes tipos de estos quimiorreceptores antenales relacionados con la comunicación química para diferentes especies como en hembras y machos de *Phyllopertha diversa* W. (Hansson *et al.*, 1999), *Anomala cuprea* H., 1839 (Leal y Mochizuki 1993), *Popillia japonica* N. (Kim y Leal 2000) y *Phyllophaga anxia* L. (Ochieng *et al.*, 2002). En melolóntidos distribuidos en México existen registros sobre la morfología, número y distribución de todos los quimiorreceptores para las antenas de ambos sexos de *P. obsoleta* (Romero-López *et al.*, 2004), *P. ravidata* (Romero-López *et al.*, 2010c), *P. opaca* (Romero-López y Morón 2013, y *Phyllophaga macrocera* B. (Romero-López y Benítez-Herrera 2014), así como *M. mexicanus* y *M. nigripes* B. (Romero-López *et al.*, 2017).

Los únicos reportes en este sentido para el género *Cyclocephala* son los correspondientes a machos de *C. lurida* (los cuales respondieron a extractos de hembras hexánicos o de éter en pruebas de campo) (Potter, 1980) y los relacionados con pruebas de electroantenografía llevadas a cabo con hembras y machos de *C. lunulata* (Romero-López *et al.*, datos no publicados).

3. Justificación

A pesar de que en la década de los 90's se registró un avance sustancial en estudios sobre ecología química de insectos y en particular, de los integrantes de la familia Melolonthidae, los trabajos para especies distribuidas en México aún resultan escasos y se han concentrado principalmente en especies de importancia económica de los géneros *Phyllophaga* y *Macroductylus*. De manera general, estas investigaciones se han enfocado en establecer esquemas de comunicación química que controlan diversos comportamientos, específicamente el sexual. La mayoría de estos trabajos reportan la morfología de epitelios y glándulas de las hembras que se encargan de sintetizar mensajes químicos para la atracción de los machos. Sin embargo, existen evidencias de la colaboración de microorganismos en la síntesis de infoquímicos para regular diferentes actividades.

No obstante, hay especies de melolóntidos como las del género *Cyclocephala* que por no ser claro los efectos negativos que puedan tener en los cultivos agrícolas carecen de información sobre sus esquemas de comunicación química sexual. Más aún, la posibilidad de la existencia de microorganismos que estén involucrados en la producción de atrayentes sexuales es un tema sin exploración alguna en especies de este género.

Por tales razones, en el presente estudio se pretende realizar la identificación taxonómica de microorganismos que podrían estar involucrados en la producción de atrayentes o feromonas sexuales y de agregación que actúan de manera intra como inter específica. Para tal propósito, se propone el uso del gen marcador molecular ARNr 16S para una identificación confiable y rápida. Asimismo, para respaldar la caracterización molecular y conocer las características metabólicas se plantean pruebas microbiológicas y bioquímicas. De esta manera, la caracterización de microorganismos residentes de zonas específicas de los aparatos reproductores de hembras y machos de *C. lunulata*, nos proporcionará información sobre la identidad de microorganismos que probablemente participen en el esquema de comunicación química de melolóntidos que regula las actividades reproductivas.

Además, este estudio brindaría claridad acerca de una posible relación simbiótica entre los coleópteros y los microorganismos localizados en sus aparatos

reproductores, lo que abre nuevas líneas de investigación poco exploradas. Finalmente, a mediano plazo el conocimiento generado en éste trabajo podría brindar los elementos para implementar programas de manejo basados en el uso de sustancias químicas potencialmente producidas por los microorganismos, adicionalmente a las que se producen en los epitelios especializados de las hembras.

4. Hipótesis

1.- En el interior de la cámara genital de las hembras y en la cápsula genital de los machos de *C. lunulata* existen bacterias que se pueden identificar mediante herramientas microbiológicas, moleculares y bioquímicas.

2.- Las bacterias residentes de la cámara genital de las hembras y la cápsula genital de los machos poseen potencial metabólico para la producción de atrayentes sexuales.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar taxonómicamente microorganismos con potencial químico-ecológico residentes del interior del aparato reproductor de hembras y machos de *C. lunulata* para obtener información sobre la comunicación química de los coleópteros Melolóntidos.

5.2. Objetivos particulares

1.- Cultivar y aislar microorganismos partir de muestras de sitios específicos del aparato reproductor de hembras y machos de *C. lunulata*.

2.- Identificar taxonómicamente los microorganismos aislados utilizando el gen marcador molecular ARNr 16S.

3.- Efectuar estudios microbiológicos y bioquímicos de los microorganismos aislados del aparato reproductor de ambos sexos con la finalidad de conocer sus características morfológicas y metabólicas.

6. Material y métodos

6.1. Disección de aparato reproductor de *C. lunulata* y cultivo de microorganismos

Los adultos de *C. lunulata* se recolectaron en los jardines de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). La recolecta se efectuó durante los meses de mayo y junio del 2015, entre las 19:30 y las 21:00 hrs. Una vez obtenidos los adultos, se efectuó la identificación taxonómica y el sexado con base en información obtenida de Morón *et al.*, (1997) y Aragón (*com. pers.*). Estos insectos se colocaron en grupos de diez individuos (cinco parejas) en recipientes de plástico de 1 L, con un tercio del volumen con suelo y materia vegetal para su alimentación.

Posteriormente, para aislar los microorganismos se extrajo el aparato reproductor de cada hembra y macho en un ambiente estéril usando materiales y soluciones en condiciones de asepsia y esterilidad. Primeramente, las hembras y los machos de *C. lunulata* fueron lavados con agua corriente para eliminar residuos de suelo y cualquier otra sustancia ajena a estos. Se seleccionaron aquellos individuos con apariencia externa “sana” (cuerpo sin heridas ni magulladuras, con apéndices completos). Después, los individuos seleccionados se lavaron con etanol al 96% para eliminar los residuos que pudieran encontrarse en la cutícula. Posteriormente, cada individuo se colocó en una caja Petri con solución Ringer para que al momento de la disección se evitara la deshidratación del mismo. A continuación, con ayuda de unas pinzas de disección y apoyándose para una mejor observación con un microscopio estereoscópico marca Velab, se retiraron las placas genitales ventrales y los sacos aéreos para obtener el aparato reproductor tanto de hembras como de machos. Se diseccionaron la cámara genital y las glándulas genitales de cuatro hembras de *C. lunulata*, evitando probable contaminación mediante lavados con etanol y con el uso de solución Ringer esterilizada previamente.

Una vez obtenidas las cámaras genitales, fueron seccionadas transversalmente y con el asa bacteriológica se tomaron muestras del lado izquierdo y del lado derecho de su interior, las cuales se sembraron en placas con medio Luria Bertani sólido (medio LB). Las glándulas accesorias se retiraron de la cámara genital, fueron

enjuagadas con etanol y se separaron según su clasificación (glándulas accesorias tipo I y II). Se tomó un raspado del interior de cada tipo de glándula y fue sembrado en placas con medio LB sólido. También se extrajo el intestino de cada una de las hembras, el cual fue enjuagado en etanol y el interior de éste fue sembrado en placas de medio LB, con el fin de tomarlo como muestra de referencia (control positivo). Como controles negativos se tomó una muestra de solución Ringer sin usar y usada en los lavados de estructuras corporales diseccionadas.

Del mismo modo, se extrajeron la cápsula genital, testículos y glándulas accesorias de cuatro machos en las condiciones de esterilidad y asepsia. Cada estructura fue lavada con etanol absoluto, depositada en solución Ringer y sembrada en medio estéril LB. Se emplearon el mismo tipo de controles positivos y negativos que los utilizados para hembras. Todas las placas Petri preparadas fueron incubadas durante 24 hrs. a 37 °C en una incubadora bacteriológica y almacenadas en refrigeración a 4 °C para las pruebas posteriores.

Los microorganismos obtenidos fueron aislados primeramente mediante resiembras de colonias con morfologías diferentes y posteriormente mediante la técnica de dilución limitante. Para tal efecto, se cultivó una colonia aislada en 5 ml de medio LB líquido durante toda la noche, en agitación constante. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-10} utilizando medio LB líquido. A continuación, se sembraron 15 μ l de las diluciones bacterianas en placas Petri con medio LB sólido. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Una vez aislados los microorganismos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se describió la morfología colonial mediante observaciones en una cámara de conteo. Posteriormente, se tomó una fracción de una UFC y se resembró para mantenimiento y para describir la morfología bacteriana utilizando la tinción de Gram. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico.

6.2. Estudios de identificación por ARNr 16s

Para realizar la identificación taxonómica de los microorganismos aislados previamente del aparato reproductor de hembras de *C. lunulata*, se utilizó como marcador molecular al gen ARNr 16S. Se cultivó cada tipo de colonia bacteriana en

50 ml de medio líquido LB por 12 hrs. para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN de acuerdo a las instrucciones del Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). El ADN genómico fue almacenado a 4°C hasta su uso.

La concentración y calidad del ADN fue cuantificada por las lecturas de absorbancia a 260 y 280nm en un nanodrop en el Centro de Biodetección Molecular de la BUAP. La integridad del ADN genómico se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x. A continuación, se realizó la amplificación de dos segmentos del gen ARNr 16S por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La reacción 1 amplificó del nucleótido 8 al 907 y la reacción 2, del nucleótido 533 al 1492 del gen marcador molecular el cual tiene aproximadamente 1500pb. Los iniciadores de PCR que se utilizaron fueron universales y han sido reportados en numerosos trabajos por su eficiencia y especificidad (Ben-Dov *et al.*, 2006; Dolinšek *et al.*, 2013). Las características de ambas reacciones se muestran en el cuadro 1. Los amplicones obtenidos de las dos reacciones de PCR fueron teñidos con 1X del reactivo EZ-visión, separados por una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % durante 1.5 hrs. a 60 v y visualizados en un transiluminador UV. El peso molecular de los amplicones fue determinado por la comparación con la migración del marcador molecular 100 pb.

Consecutivamente, los amplicones de PCR fueron purificados a partir de corte de banda siguiendo las indicaciones del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Una vez verificada la concentración del amplicon, se realizó la secuenciación mediante el método de Sanger en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el software Bioedit 7.0 de libre distribución. Para identificar el género y especie de las bacterias aisladas se realizó un alineamiento de tipo BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comparar las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S con secuencias de referencia registradas en la base de datos.

Cuadro 1. Cuadro de condiciones para amplificar PCR. Condiciones de las reacciones de PCR para amplificar 1500 pb del gen ARNr 16s de las bacterias obtenidas de la cámara genital de hembras de *Cyclocephala lunulata*

	Reacción 1	Reacción 2
ADN genómico	10 ng	10 ng
Amortiguador 10X	1X	1X
dNTPs (A, C, G y T)	200 µM	200 µM
Iniciadores sentido (F) y antisentido (R)	8F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' 907R 5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3' 1 µM	533F 5' GTGCCAGCAGCCGCGGTAA 3' 1496R 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' 1 µM
MgCl₂	2 Mm	1.5 mM
Taq polimerasa	1.25 unidades	1.25 unidades
Agua estéril	Completar a 20 µl	Completar a 20 µl
Ciclado	94 °C - 5 min 94 °C - 45 s 55 °C - 1 min 72 °C - 1.5 min 72 °C - 10 min	94 °C - 5 min 94 °C - 45 s 56 °C - 1 min 72 °C - 1.5 min 72 °C - 10 min

Consecutivamente, los amplicones de PCR fueron purificados a partir de corte de banda siguiendo las indicaciones del kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Una vez verificada la concentración del amplicon, se realizó la secuenciación mediante el método de Sanger en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el software Bioedit 7.0 de libre distribución. Para identificar el género y especie de las bacterias aisladas se realizó un alineamiento de tipo BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comparar las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S con secuencias de referencia registradas en la base de datos.

6.3. Pruebas microbiológicas: cultivos en medios selectivos

Con la finalidad de estudiar las condiciones de crecimiento de las bacterias aisladas cultivables en medio LB sólido, se procedió a realizar siembras en seis medios selectivos generales. A continuación se describe el fundamento de cada medio de cultivo utilizado:

- Medio sal y manitol, altamente selectivo para microorganismos que crecen con altas concentraciones salinas y que pueden o no fermentar manitol.
- Medio MacConkey, se utiliza para el aislamiento de microorganismos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos.
- Medio Eosina y azul de metileno, empleado para identificar microorganismos fermentadores o no de lactosa, así como para inhibir el desarrollo de microorganismos Gram positivos y de Gram negativos.
- Medio Salmonella Shigella, altamente selectivo para inhibir el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos Gram positivos de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor de *Proteus* spp. También muestra organismos fermentadores de lactosa y de producción de ácido sulfhídrico.
- Medio Hierro triple azúcar T.S.I. (por sus siglas en inglés), es universalmente empleado para la diferenciación de entero-bacterias con base en la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.
- Medio citrato de Simmons, muy utilizado para la diferenciación de entero-bacterias con base en la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

Todos los medios selectivos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes Bioxon y Dibico (ver Anexo). Además, para asegurar la esterilidad de todos los medios de cultivo se realizó la prueba de esterilidad mediante la incubación de las placas Petri con cultivo sólido a 37 °C durante 24 h.

Para las bacterias del intestino se realizaron algunas pruebas en algunos medios selectivos para conocer algunas características que pudieran ser comparadas con las bacterias encontradas en el aparato reproductor. Los medios donde fueron sembradas las bacterias del intestino fueron el medio sal y manitol, MacConkey, eosina azul de metileno, citrato de Simmons y hierro triple azúcar.

6.4. Pruebas bioquímicas

Para estudiar el metabolismo de las bacterias encontradas previamente en hembras y machos, se efectuaron pruebas bioquímicas con el sistema miniaturizado "API

20e” marca Biomérieux. Esta prueba consta de veinte análisis bioquímicos estandarizados, lo cual permite realizar numerosas pruebas a la vez con veinte cápsulas con distintos sustratos deshidratados. La prueba funciona a partir de una colonia aislada re suspendida en 5 ml de solución salina (1% de cloruro de sodio) la cual pasa a una colocación hasta llenar la cúpula en cada una de las galerías API20, después de esto las galerías se incuban durante 24 h a 38 °C, y se interpreta con la tabla de resultados incluida en el paquete.

7. Resultados

7.1. Bacterias de la cámara genital de hembras de *Cyclocephala lunulata* cultivadas en medio LB sólido

Para identificar microorganismos con potencial químico-ecológico del aparato reproductor de un melolóntido distribuido en México se procedió a cultivar en medio nutritivo las muestras obtenidas durante una microdissección de la cámara genital y glándulas accesorias tipo I y II de las hembras de *C. lunulata*. El crecimiento bacteriano se realizó a 37°C por 24 horas en condiciones de aerobiosis.

Como se observa en la figura 3 A y B en las placas donde fueron sembradas las muestras de cámara genital del lado izquierdo y derecho, crecieron colonias bacterianas con morfologías diferenciables macroscópicamente (Figura 3). Las colonias obtenidas fueron clasificadas conforme su morfología colonial. De acuerdo a estas características básicamente se obtuvieron tres tipos de colonias bacterianas para las cámaras genitales de los cuatro especímenes utilizados en este trabajo. Estas colonias bacterianas fueron nombradas como “CamGenBe♀”, “CamGenA♀” y “CamGeBI3”, las cuales posteriormente se sembraron y aislaron para su descripción macro y microscópica.

En las placas Petri correspondientes a la siembra de las glándulas accesorias tipo I y II no se observó crecimiento de microorganismos en ninguna de las dieciséis placas de las cuatro hembras diseccionadas. En las placas de medio LB donde se realizó la siembra con solución Ringer antes y después de estar en contacto con las estructuras reproductoras, no crecieron microorganismos.

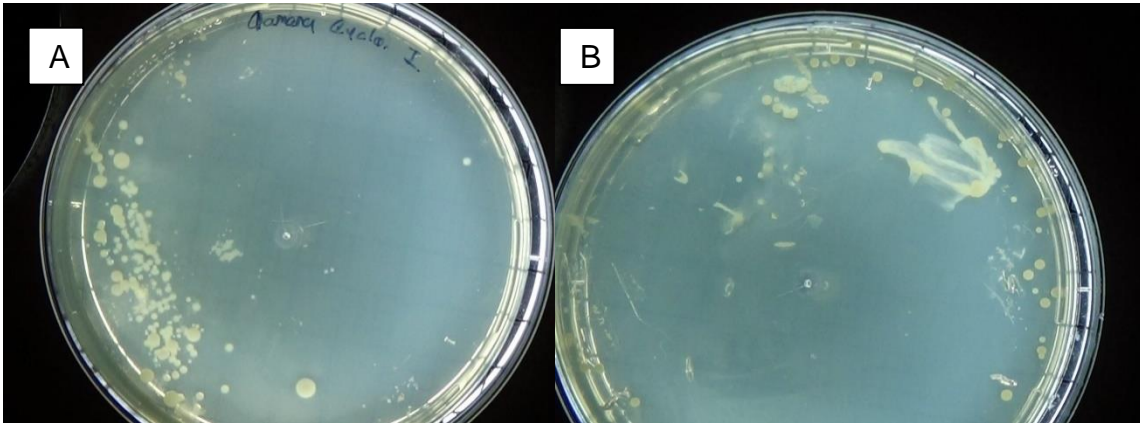


Figura 3. Bacterias extraídas de la cámara genital de hembras de *Cycocephala lunulata* cultivadas en medio LB. Las placas Petri fueron visualizadas en un contador de colonias y fueron fotografiadas con una cámara digital Fuji modelo s100. A.- Cultivo obtenido del lado izquierdo de la cámara genital. B.- Cultivo obtenido del lado derecho de la cámara genital.

7.2. Bacterias de la cápsula genital de machos de *Cycocephala lunulata* cultivadas en medio LB sólido

En la cápsula genital de los machos de esta especie se encontró un mismo tipo de colonia bacteriana, a la cual se le denominó CapGen♂ (Figura 4), cuya descripción de morfología colonial y bacteriana se explica en el cuadro 2.

En las placas de Petri donde se sembraron muestras de las glándulas accesorias y conductos seminales del aparato reproductor de los machos, no hubo crecimiento de ningún tipo de bacterias. En las placas de Petri inoculadas con muestras obtenidas de los testículos creció una colonia en una placa de cultivo. Por lo tanto, al no crecer microorganismos en el resto de las repeticiones de cultivos estas bacterias fueron descartadas para estudios posteriores.

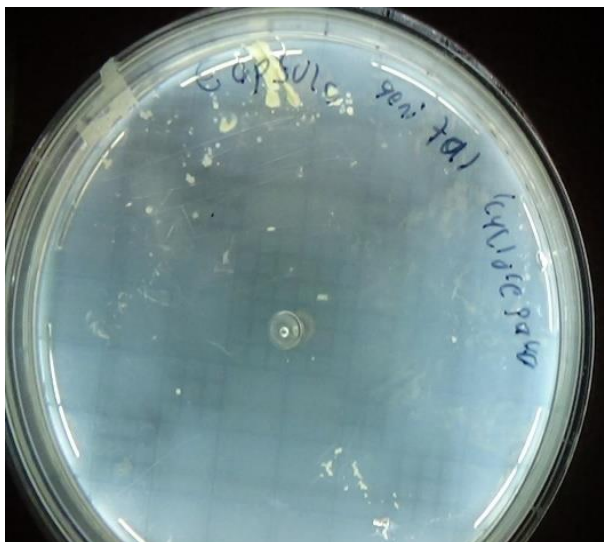


Figura 4. Bacterias extraídas de la capsula genital de *Cyclocephala lunulata*, cultivadas en medio LB. Las placas Petri fueron visualizadas en un contador de colonias y fueron fotografiadas con una cámara digital Fuji modelo s100.

7.3. Descripción morfológica de las bacterias encontradas en la cámara genital de hembras y machos de *C. lunulata*

Con el objetivo de aislar colonias distinguibles de los cultivos originales obtenidos directamente de la cámara o cápsula genital, se realizó la técnica de dilución limitante obteniéndose placas de Petri con un solo tipo de bacteria. Posteriormente, se describió la morfología colonial y bacteriana de las cuatro colonias aisladas de hembras y machos (cuadro 2). Las colonias CamGenBe♀, presentaron color beige, forma circular, borde redondeado, elevación y superficie convexa y una consistencia cremosa; luz transmitida iridiscente (Figura 5, letra A y B), luz reflejada brillante, con un crecimiento favorable en medio LB, presentando un olor característico que en forma cualitativa, presenta un olor a “fruta en descomposición”. Son cocos Gram negativos (Figura 6 A).

La morfología colonial de CamGenA♀, presentó un color amarillo con forma circular, borde redondeado, elevación y superficie convexa y una consistencia cremosa, tiene un crecimiento regular colonias bien definidas y fáciles de aislar (Figura 5 C), así como muestras una morfología bacteriana de cocos Gram negativos (Figura 6 B). En el caso de las colonias identificadas como CamGeBI3♀, son colonias que presentan un color blanco con forma circular, borde redondeado, elevación y

superficie convexa y una consistencia cremosa, son colonias bien definidas y fáciles de aislar (Figura 5 D). En la morfología bacteriana son cocos Gram negativos (Figura 6 C). Por último, las colonias obtenidas en la cápsula genital de macho identificadas como CapGen♂ son colonias que presentan un color amarillo con forma circular, borde redondeado, elevación y superficie convexa y una consistencia cremosa, tiene un crecimiento regular de colonias medianas bien definidas y fáciles de aislar (Figura 5 E). Sin embargo, en cada resembrado las colonias se redujeron en tamaño y en cantidad. Presentan una morfología bacteriana de cocos Gram negativos (Figura 6 D).

Cuadro 2. Tabla de características morfológicas. Morfología colonial de bacterias cultivables de la cámara genital de hembras y cápsula genital de macho de *Cyclocephala lunulata*.

Característica	Bacterias			
	CamGenBe♀	CamGenA♀	CamGeBI3♀	Capgen♂
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Redondeado	Redondeado	Redondeado	Redondeado
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Consistencia	Creмоса	Creмоса	Creмоса	Creмоса
Color	Beage	Amarillo	Blanco	Amarillo
Luz transmitida	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Tamaño	1-2 mm	1 mm	0.5 -1 mm	0.5-1mm
Olor	Pronunciado	Pronunciado	Pronunciado	Pronunciado
Tipo de bacteria	Coco	Coco	Coco	Coco
Clasificación	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -

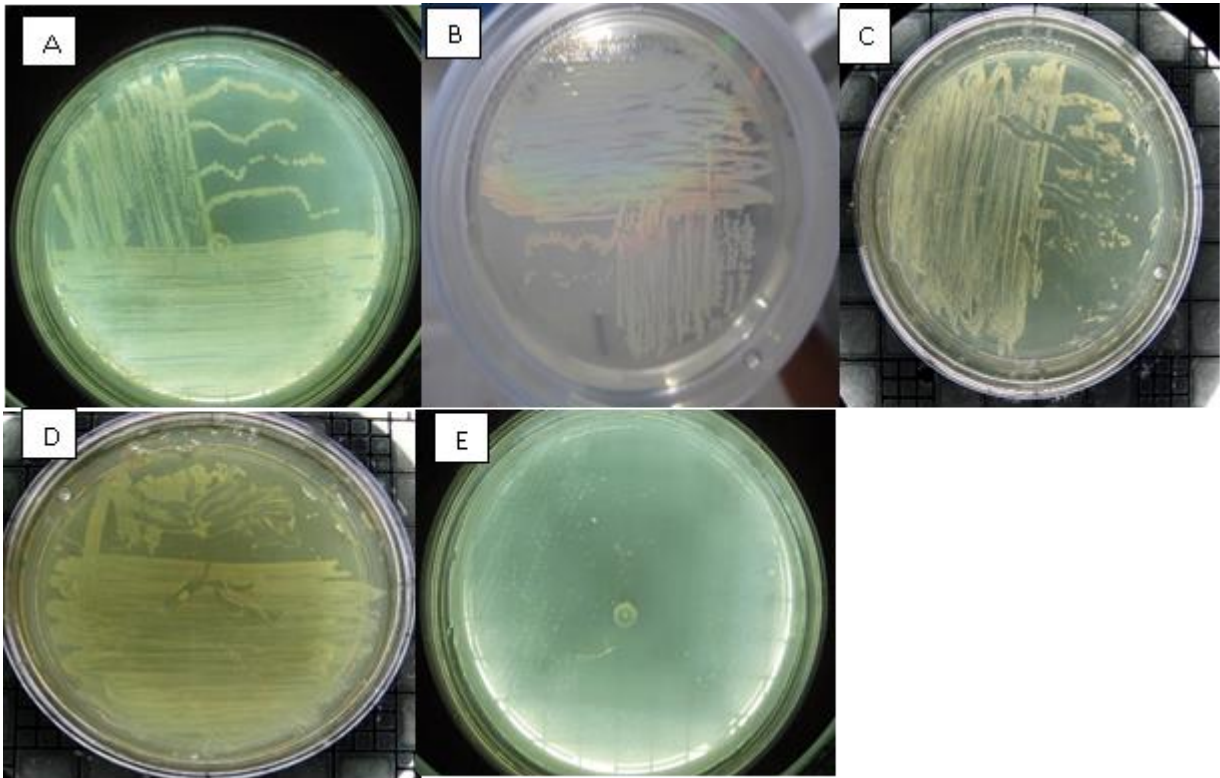


Figura 5. Colonias aisladas por dilución limitante encontradas en la cámara genital de *Cyclocephala lunulata* (A, B, C, D) y en la cápsula genital de la misma especie (E), sembradas en medio LB y vistas desde un contador de bacterias. Foto tomada con una cámara digital (marca). A.- Colonia bacteriana CamGenBe♀; bacteria con crecimiento masivo en la parte inferior de la placa y con crecimiento aislado en la parte superior. B. Placa de medio LB donde está sembrada CamGenBe♀, colonia vista a contraluz mostrando iridescencia. C.- Colonias bacterianas CamGenA♀ en medio LB. D.- Colonia bacteriana CamGenBI3♀ E.- Colonia obtenida de la cápsula genital de machos de *C. lunulata* (CapGen♂), en donde puede observarse un crecimiento escaso en el medio LB tanto en el sembrado masivo como en el aislado.

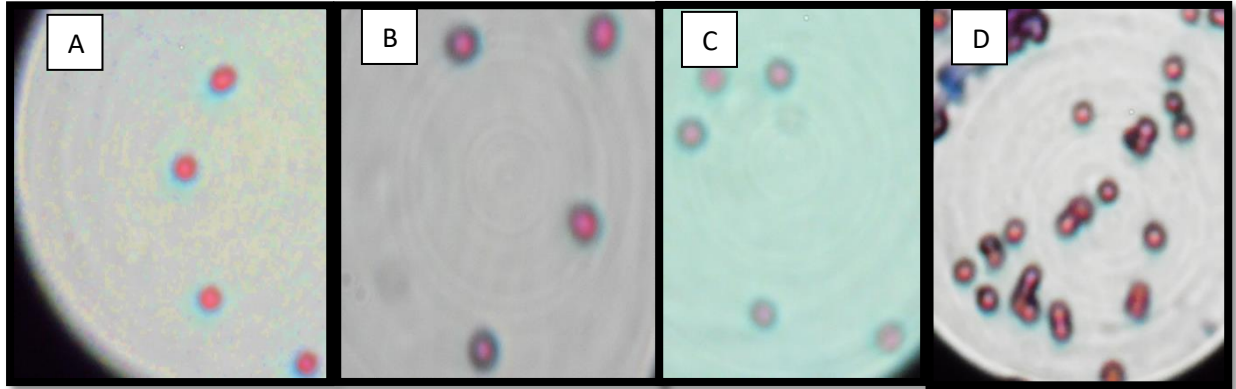


Figura 6. Morfología bacteriana de las colonias extraídas de la cámara genital y la cápsula genital de *Cyclocephala lunulata*. A.- CamGenBe♀; B.- CamGenA♀; C.- CamGeBl3♀. D.- Capgen♂. Las bacterias fueron identificadas por tinción de Gram; los cuatro tipos son considerados como cocos Gram negativos al poseer una capa delgada de peptidoglicano, así como una membrana externa, por lo cual permite que el colorante rojo las tiña.

7.4. Identificación por taxonomía molecular de las bacterias aisladas de la cámara genital de hembras *Cyclocephala lunulata*

Una vez que se obtuvieron colonias bacterianas aisladas se realizó una descripción general macro y microscópica para subsecuentemente utilizar estas bacterias en la identificación por taxonomía molecular. El ADN genómico fue aislado y cuantificado únicamente para las bacterias de la cámara genital de hembras ya que las bacterias de cápsula genital de macho no se pudieron re-sembrar debido a que las condiciones de medio del cultivo, temperatura, sales, etc. no fueron óptimas para su crecimiento y mantenimiento.

La identificación taxonómica se realizó utilizando el gen marcador ARNr 16s, el cual fue amplificado por PCR punto final utilizando iniciadores universales. El único amplicón obtenido con la pareja de iniciadores 8F y 907R correspondió al peso molecular esperado de 900 pb. De igual manera, para la reacción de PCR usando los iniciadores 533F y 1492R se obtuvo un solo amplicón con el peso molecular deseado de 960pb (Figura 7).

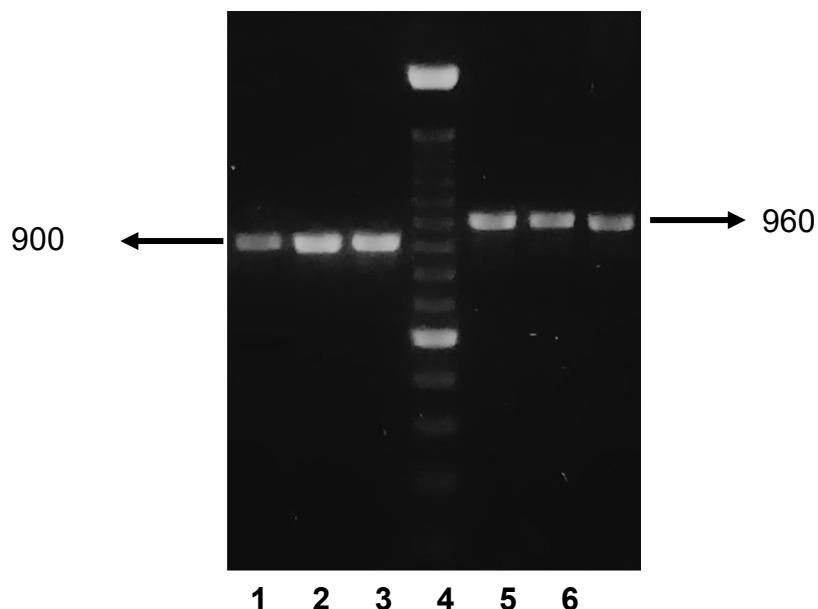


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de PCR del gen ARNr 16S. Línea 1, 2 y 3 amplicones de 900 pb obtenidos de la amplificación con los iniciadores 8F/907R. Las muestras corresponden al ADN genómico obtenido de las colonias CamGenBe♀, CamGenA♀ y CamGeBI3, respectivamente. Línea 4 marcador de peso molecular 100 pb. Líneas 5, 6 y 7 productos de PCR de 960 pb obtenidos de la PCR usando los iniciadores 533F/1492R. El ADN amplificado procede de las colonias CamGenBe♀, CamGenA♀ y CamGeBI3, correspondientemente. Los amplicones fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X durante 1.5 h a 60 volts. Las bandas de ADN fueron teñidas con EZ-VISION 1X y visualizadas con un transiluminador UV. El gel fue fotografiado con una cámara Fuji y la imagen fue digitalizada usando el programa CorelDraw.

Subsecuentemente, los amplicones fueron purificados mediante extracción a partir de geles de agarosa y enviados para su secuenciación por el método de Sanger. La calidad de las secuencias obtenidas fue analizada con el programa Chromas mediante la exploración de los electroferogramas para las secuencias sentido y antisentido de los dos amplicones (8F/907R y 533F/1492R). Debido a que la secuencia de las colonias CamGeBI3 no fue de buena calidad solamente se utilizaron las secuencias obtenidas para las bacterias CamGenBe♀ y CamGenA♀ para realizar el estudio bioinformático (Fig. 8, letra A y B).

Las secuencias arriba mencionadas se ensamblaron obteniéndose una secuencia de 790pb para CamGenBe♀ y 810pb para CamGenA♀. La identidad de las bacterias aisladas fue determinada usando el algoritmo BLAST, el cual compara las secuencias del gen ARNr 16S almacenadas en la base de datos NCBI con las secuencias proporcionadas por el usuario. En el caso de las bacterias CamGenBe♀, se obtuvo un total de 120 coincidencias con la base de datos, comparándose con 100 de las coincidencias, con un score máximo y total de 1472, 99% de identidad

en un 100% de secuencia cubierta y un E-value de 0.0% con secuencias de *Klebsiella oxytoca*. Para las secuencias de las bacterias CamGenA♀ el análisis de BLAST reveló 136 coincidencias, comparándolas con las 100 donde se presentó una mayor coincidencia, un máximo score de 1860 y un score total de 14808, cubriendo el 100% de la secuencia con un 99% de identidad y un E-value de 0.0% con *Citrobacter freundii*.

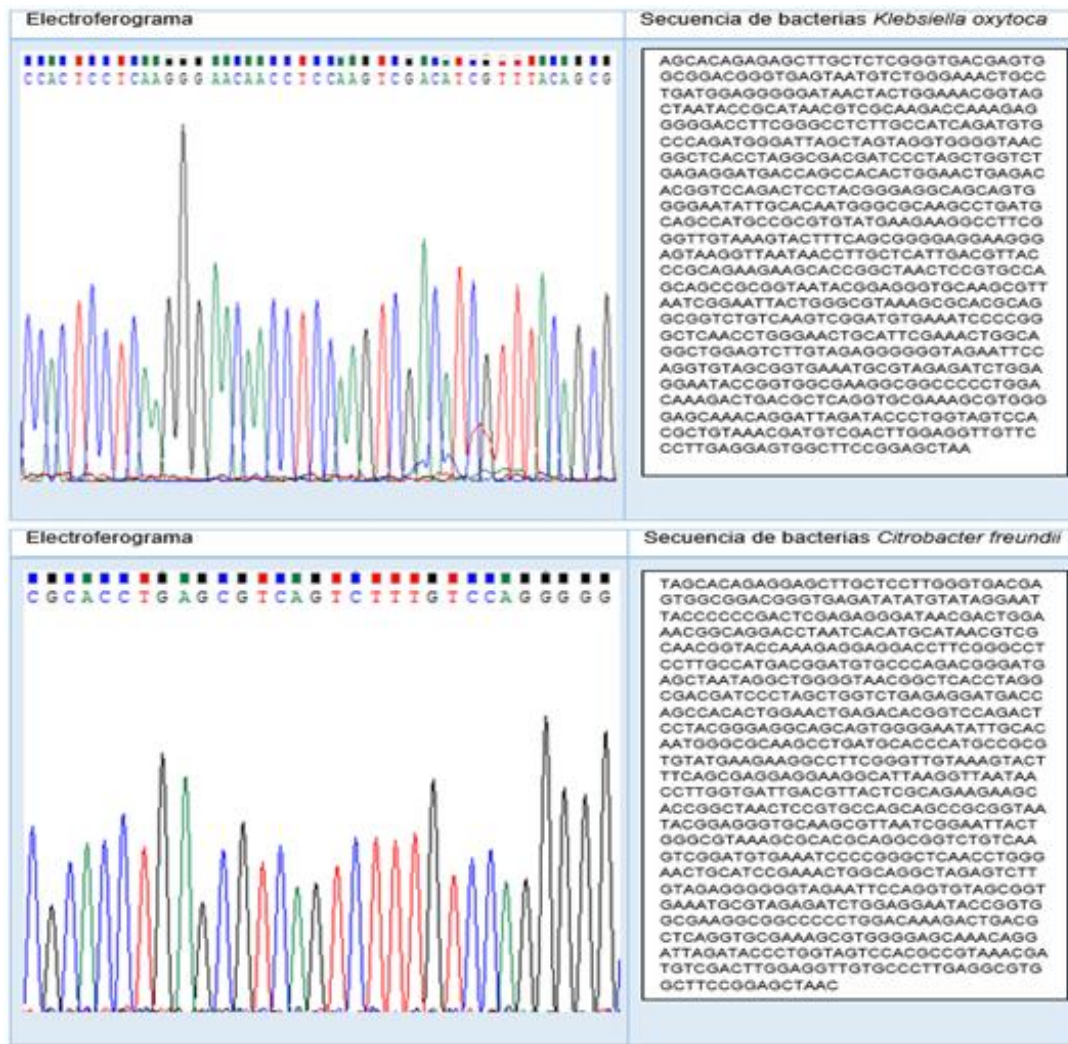


Figura 8. Electroferogramas y secuencias del gen ARNr 16S de bacterias aisladas de la cámara genital de *Cyclocephala lunulata*. Sección de un electroferograma visualizado en el programa Chromas versión 2.6 licencia libre, así como las secuencias ensambladas mediante el programa BioEdit V7.2.5 (libre distribución) para dos colonias obtenidas de la cámara genital de *Cyclocephala lunulata*. A.- Secuencia de 790 pares de bases para su identificación como *Klebsiella oxytoca*. B.- Secuencia de 810 para su identificación como *Citrobacter freundii*.

7.5. Caracterización de condiciones de crecimiento en medios selectivos

Para ahondar en la caracterización microbiológica de bacterias identificadas molecularmente y las otras bacterias residentes de cámara y cápsula genital se procedió a estudiar las condiciones y restricciones de crecimiento mediante al cultivo en medios selectivos generales. A continuación se describe las respuestas de las cuatro tipos de bacterias aisladas.

Sal y manitol

En el medio sal y manitol, *K. oxytoca* (antes CamGenBe♀) y *C. freundii* (antes CamGenA♀) tuvieron crecimiento positivo indicando tolerancia a la alta concentración de sal del medio, el cual se tornó de color anaranjado a amarillo mostrando uso de manitol. Para CamGeBI3♀, se observó un crecimiento positivo en este medio tolerando la concentración sal, pero sin uso de manitol ya que no se observó viraje en el color del medio. Finalmente, Capgen♂ no tuvo crecimiento mostrando intolerancia a la sal (Figura 9 A, B, C y D).

Medio MacConkey

K. oxytoca tuvo crecimiento positivo en este medio sin fermentación de lactosa, mientras que para las colonias de *C. freundii* se observó el crecimiento positivo con colonias color rosa indicando reacción positiva a fermentación de lactosa. Para las colonias CamGeBI3♀ al igual que Capgen♂ el medio MacConkey no fue favorable para su crecimiento y no se pudo determinar la fermentación de lactosa (Figura 9 E, F, G y H)

Eosina azul de metileno

K. oxytoca tuvo un resultado positivo visualizándose colonias color “verde metálico” (Figura 11) que indica la producción de ácido sulfúrico, mientras que *C. freundii* tuvo un resultado positivo en este medio y las colonias presentaron puntos negros lo que indica que son fermentadoras de lactosa y/o sacarosa. El crecimiento en éste medio corroboró la tipificación como bacterias Gram (-) ya que éste medio es selectivo para éste tipo de bacterias. Tanto CamGeBI3♀ como Capgen♂ presentan un crecimiento negativo en este medio (Figura 9 I, J, K y L).

Agar Salmonella Shigella

En este medio se observó un crecimiento positivo para *K. oxytoca* con colonias que presentaron un color rosado que indica que son fermentadoras de lactosa (Figura 9 M). *C. freundii* también tuvo un crecimiento visualizándose colonias rosadas y con el centro de color negro lo que indica que son productoras de ácido sulfhídrico. Tanto CamGeBI3♀ como Capgen♂ no presentaron un crecimiento en este medio (Figura 9 N, O y P).

Agar Citrato de Simmons

K. oxytoca y *C. freundii* tuvieron un crecimiento positivo en este medio, observándose una alcalinización del medio por el viraje del color verde al azul lo que indica que utilizan citrato. Este cambio en la coloración se observa por la presencia de la citrato permeasa que desdobra al citrato para la progresión del ciclo de Krebs (Figura 10 A, B, C y D). CamGeBI3♀ y Capgen♂ no presentaron crecimiento en este medio.

Agar Hierro triple azúcar

Se denomina pico a la parte superior del agar que termina en forma de punta y fondo a la parte inferior del agar. En este medio, *K. oxytoca* (Figura 10 E) presentó la parte superior e inferior del medio amarillo lo que indica que fermenta glucosa, sacarosa y/o sacarosa, el medio subió indicando la producción de gas. *Citrobacter freundii* (Figura 10 F) presentó pico rojo y fondo rojo lo que indica que el microorganismo no es fermentador de azúcares, el ennegrecimiento del medio indica la producción de ácido sulfhídrico y el medio subió indicando la producción de gas. Con las colonias de CamGeBI3♀ se obtuvo en el tubo una coloración pico rojo y fondo rojo indicando que en ese medio no puede fermentar azúcares. Para Capgen♂, se observaron pico y fondo amarillos.

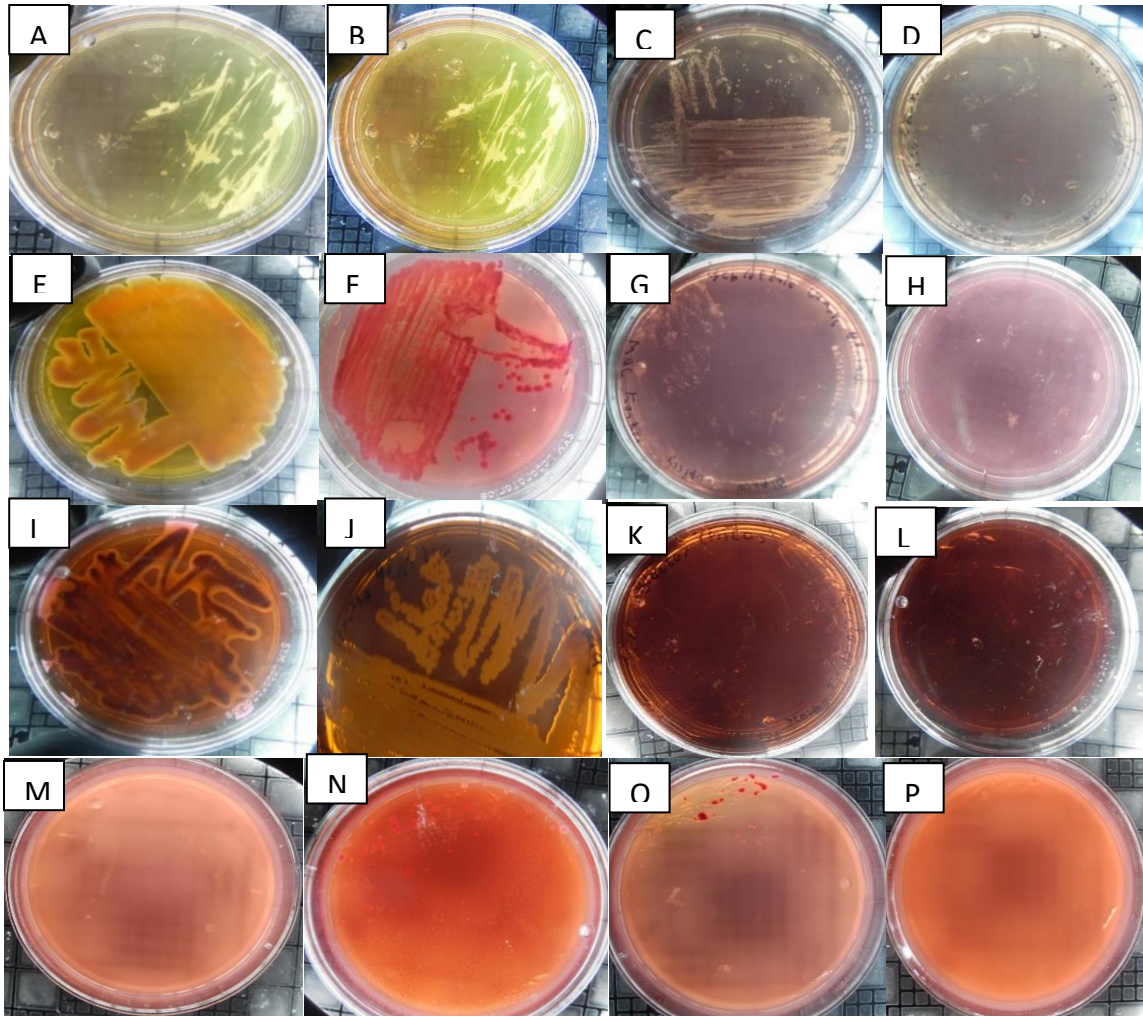


Figura 9. Cultivos de bacterias extraídas de la cámara y cápsula genital de *Cyclocephala lunulata* en medios selectivos. 1. A, B, C, D: Medio sal y manitol. A.- Bacterias de *Klebsiella oxytoca* con crecimiento positivo y cambio de coloración del medio a amarillo. B.- Bacterias de *Critobacter freundii* con crecimiento positivo y cambio de coloración del medio a amarillo. C.- Bacterias CamGeBI3 ♀ con crecimiento positivo pero sin cambio de coloración del medio. D.- Medio sal y manitol donde fueron sembradas las bacterias Capgen ♂, donde hubo crecimiento negativo de éstas. 2. E, F, G, H: Medio MacConkey. E.- Bacterias de *K. oxytoca* con crecimiento positivo y cambio de coloración del medio a amarillo. F.- Bacterias de *C. freundii* con crecimiento positivo y cambio de coloración a rosado, con pequeños puntos negros en el centro de la colonia; positivo para producción de H₂S. G.- Placa donde se sembraron las bacterias CamGeBI3 ♀, en donde hubo crecimiento negativo en este medio; se observan rastros del sembrado. H.- Placa donde se sembraron las bacterias Capgen ♂ con crecimiento negativo. 3.- I, J, K, L: Medio Eosina Azul de metileno. I.- Bacterias de *K. oxytoca* con crecimiento positivo en este medio. J.- Bacterias de *C. freundii* con crecimiento positivo en este medio; bacterias con punto negro en el centro. K.- Placa donde se sembraron bacterias CamGeBI3 ♀ con crecimiento negativo. L.- Placa donde se sembraron las bacterias Capgen ♂ donde hubo un crecimiento negativo. 4.- M, N, O, P: Medio Salmonella Shigella M.- Bacterias de *K. oxytoca* con crecimiento positivo en este medio; colonias color rosado. N.- Bacterias de *C. freundii*. O.- Placa donde fueron sembradas las bacterias CamGeBI3 ♀ con crecimiento negativo. P.- Placas donde se sembraron las bacterias Capgen ♂, sin crecimiento.



Figura 10. Bacterias obtenidas en la cápsula y cámara genital de *Cyclocephala lunulata* sembradas en gar Citrato de Simmons y agar Hierro triple azúcar. 1.- A, B, C, D: Agar Citrato de Simmons. A.- Bacterias de *Klebsiella oxytaca* con crecimiento positivo con color azul, intenso en la parte superior de este medio. B.- Bacterias de *Critobacter freundii* con crecimiento postivo, con una coloración azul intensa en la parte superior del medio. C.- Bacterias CamGeBI3♀ sembradas en este medio donde se presentó un crecimiento negativo. D.- Bacterias Capgen♂ sembradas en este medio con crecimiento negativo. 2.- E, F, G, H: Agar Hierro triple azúcar. E. Bacterias de *K. oxytaca* con crecimiento positivo y coloración amarilla: se observa que el crecimiento del medio alcanzó la parte superior del tubo. F.- Bacterias de *C. freundii* con crecimiento positivo en este medio; se observa una coloración roja en la parte superior y una coloración negra en la parte media del medio; se presentó un aumento en el crecimiento con relación al tubo. G.- En este tubo se sembraron las bacterias CamGeBI3♀, las cuales mostraron un crecimiento positivo; se aprecia una coloración roja en la parte inferior. H.- En este tubo se sembraron las bacterias Capgen♂ de la cápsula genital de machos de *C. lunulata*, donde se aprecia que tanto la parte superior como inferior son amarillas.



Figura 11. Colonias de *Klebsiella oxytoca* sembradas en medio Eosina azul de metileno. La placa fue observada a contra luz donde se aprecia una coloración verde metálica.

7.6. Pruebas bioquímicas

Para respaldar la identificación realizada por herramientas moleculares se efectuaron pruebas bioquímicas usando el sistema miniaturizado API20E selectivo para enterobacterias. Además, este estudio en el caso de bacterias que no se identificaron por taxonomía molecular aporta conocimiento general sobre las características bioquímicas de importancia para la clasificación de bacterias. Los resultados de las pruebas API20e se registraron en el cuadro 3.

Las reacciones bioquímicas de las bacterias *K. oxytoca* fueron positivas para B-galactosidasa, lisina descarboxilasa, utilización de citrato, así como para la fermentación-oxidación de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa. Las reacciones negativas fueron para arginina dehidrolasa, ornitina descarboxilasa, producción de sulfuro de hidrógeno y para la prueba de oxidasa. Para *C. freundii* se obtuvieron resultados positivos para ornitina descarboxilasa, utilización de citrato, producción de sulfuro de hidrogeno, fermentación-oxidación para algunos azúcares como el manitol, inositol, sorbitol y ramnosa. Cabe señalar que *C. freundii* dio negativo para arginina dehidrolasa, lisina descarboxilasa, ureasa, algunos azúcares como sacarosa, melobiosa, amigdaina y la prueba de oxidasa, por mencionar algunos. En cuanto a la tercera bacteria de la cámara genital de *C. lunulata* nombrada como CamGeBI3♀, se pueden resaltar los resultados positivos para la producción de acetoína, la utilización de azúcares como

glucosa, manitol, sacarosa, melobiosa y los resultados negativos para el resto de las pruebas. En el caso de las bacterias obtenidas en machos nombradas como Capgen♂, se señalan los resultados positivos para arginina dehidrolasa, la producción de acetoína y únicamente la utilización de glucosa y manitol como azúcares, siendo negativo para todas las demás pruebas.

Cuadro 3. Resultado API 20e. Resultados de las pruebas API 20e de las cuatros bacterias extraídas de los aparatos reproductores de hembras y machos de *Cyclocephala lunulata*.

Prueba	Reacción/Enzima	Colonia bacteriana			
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	CamGeB13♀	Capgen♂
NPG	B-galactosidasa	+	—	—	—
ADH	Arginina dehidrolasa	—	—	—	+
LDC	Lisina descarboxilasa	+	—	—	—
ODC	Ornitina descarboxilasa	—	+	—	—
CIT	Utilización de citrato	+	+	—	—
H2S	Sulfuro de hidrógeno	—	+	—	—
URE	Ureasa	—	—	—	—
TDA	Triptófano deaminasa	—	—	—	—
IND	Indol	+	—	—	—
VP	Acetoína	+	—	+	+
GEL	Gelatinasa	—	—	—	—
GLU	Fermentación/oxidación	+	+	+	+
MAN	Fermentación/oxidación	+	+	+	+
INO	Fermentación/oxidación	+	+	—	—
SOR	Fermentación/oxidación	+	+	—	—
RHA	Fermentación/oxidación	+	+	—	—
SAC	Fermentación/oxidación	+	—	+	—
MEL	Fermentación/oxidación	+	—	+	—
AMY	Fermentación/oxidación	+	—	—	—
ARA	Fermentación/oxidación	+	+	—	—
Oxidasa		—	—	—	—

7.7. Bacterias del intestino de hembras y machos de *Cyclocephala lunulata*

En el intestino se registró un número alto de colonias bacterianas tanto para machos como para hembras, con diferentes tipos de morfología colonial. La mayoría de estas colonias aisladas del intestino de hembras como machos se identificaron como cocos Gram positivos.

7.7.1. Medios selectivos para bacterias del intestino de hembras y machos

En el medio sal y manitol se registró para hembras un crecimiento de las colonias en cierta parte de placa (un tercio aproximadamente) y un cambio de coloración en la misma, (Figura 11 A). En machos el resultado fue similar (Figura 11 B). Para el medio MacConkey, tanto en el intestino de hembras como el de machos se observó un crecimiento positivo de colonias rosadas (Figura 11 C y D). Para el medio Eosina Azul de metileno, al igual que con los medios anteriores, el resultado fue similar en machos y hembras, con un crecimiento positivo con un color oscuro de las colonias (Figura 11 E y F), lo que indica que son fermentadores de lactosa; sin embargo las colonias no presentan ninguna coloración verde metálico. Para el medio Citrato de Simmons, tanto en el intestino de hembras como en el de machos se obtuvo un crecimiento negativo (Figura 11 G y H), por lo que no se presentó cambio de coloración ni crecimiento, por lo cual puede sugerirse que estas bacterias no utilizan citrato como sustrato. Dentro del medio Hierro triple azúcar se observó un crecimiento positivo de bacterias con una superficie ácida y profundidad ácida, propio de microorganismos que fermentan glucosa, lactosa y/o sacarosa (Figura 11 I).

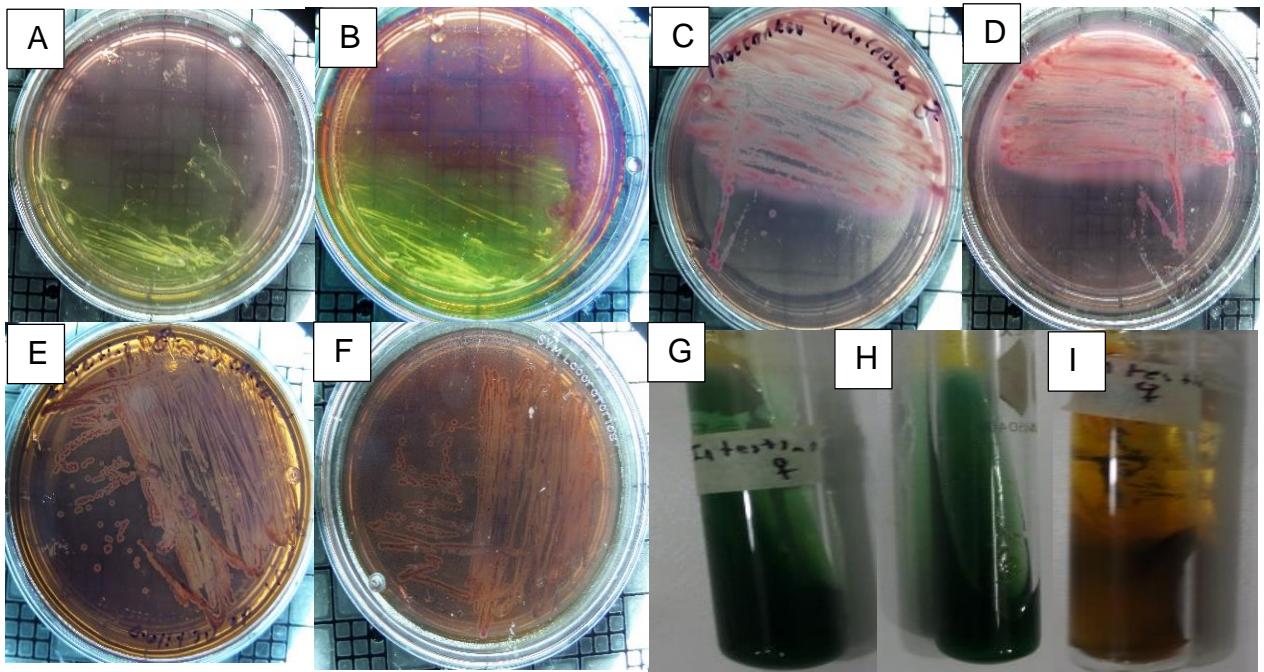


Figura 11. Medios selectivos de las bacterias obtenidas del intestino de hembras y machos de *Cyclocephala lunulata*. A.- Bacterias obtenidas del intestino de hembras en medio sal y manitol con crecimiento positivo en una parte de la placa, donde se ve el cambio de coloración. B.- Bacterias obtenidas del intestino de machos en medio sal y manitol con crecimiento positivo en una parte de la placa donde se ve el cambio de coloración. C.- Bacterias de hembras en medio MacConkey, donde se ve un crecimiento positivo. D.- Bacterias de intestino de machos en medio MacConkey donde se ve un crecimiento positivo. E.- Bacterias de intestino de hembras en medio Eosina azul de metileno con crecimiento positivo y que además muestran un cambio de coloración. F.- Bacterias de intestino de hembras en medio Eosina azul de metileno con crecimiento positivo y cambio de coloración del medio. G.- Medio Citrato de Simmons donde fueron sembrados bacterias del intestino de hembras con crecimiento negativo. H.- Medio Citrato de Simmons donde fueron sembradas bacterias del intestino de machos con crecimiento negativo. I.- Hierro triple azúcar donde fueron sembradas las bacterias de intestino de hembras con crecimiento positivo.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aislaron tres tipos de bacterias dentro de la cámara genital de las hembras de *C. lunulata*. Este hallazgo coincide con lo reportado para *P. ravidia* (Pérez-Estrada, 2016), quien señala que en el interior de la cámara genital de hembras de esta última están alojadas dos tipos de colonias bacterianas y lo reportado en *C. zealandica* (Hoit *et al.*, 1997) donde fueron identificados en las glándulas accesorias, la diferencia del presente trabajo con los anteriores radica en que se realizó una identificación taxonómica sobre la identidad de algunos de estos microorganismos.

Mientras que para *C. lunulata* las bacterias se localizaron en la cámara genital, en *C. zealandica* se encontraron en el interior de las glándulas accesorias. En sentido estricto, no se trata de una diferencia concluyente, ya que en los melolóntidos en general tanto cámara genital como glándulas se encuentran en la misma zona del aparato reproductor y están conectadas por un mismo conducto (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Aunque se desconoce si pudiera presentarse movimiento de bacterias de una estructura a otra, tampoco se cuenta con elementos para descartar la posibilidad de que el contenido bacteriano de las glándulas accesorias sea en realidad parte de las bacterias de la cámara genital y que la ausencia de estas en las primeras se deba al manejo del instrumental al momento de las disecciones. En el caso del aparato reproductor de los machos de *C. lunulata*, se encontró un solo tipo de colonias bacterianas dentro de la cápsula genital, siendo este el primer reporte para los melolóntidos sobre la posible participación de microorganismos en la producción de feromonas de agregación.

8.1. Identificación taxonómica de bacterias

Se pudieron identificar molecularmente dos de las cuatro colonias obtenidas en el aparato reproductor de las hembras de *C. lunulata*: CamGenBe♀ que fue identificada como *K. oxytoca* y CamGenA♀ cuya identidad fue la de *C. freundii* con un 99% de identidad en 100% de secuencia cubierta, indicando un alto grado de confiabilidad en la identificación. Para la colonia CamGeBI3♀, la secuencia obtenida no cumplió con los requisitos de calidad debido a inconsistencias con las reacciones

de amplificación o secuenciación de ADN. Las colonias Capgen♂, a pesar de que en una primera instancia crecieron en medio LB en cada resiembra, el tamaño y número de colonias disminuyó probablemente porque las condiciones generales del medio (temperatura, concentración de sales, pH, etc.) no fueron las óptimas para su nutrición y metabolismo. Esto permite sugerir que se trata de bacterias que requieren condiciones estrictas y habría que probar su crecimiento en medios básicos y especiales o mejorados.

Tanto *K. oxytoca* como *C. freundii* han sido identificadas en otros organismos usando como gen marcador molecular al ARNr 16s ya que es una herramienta altamente confiable y rápida para confirmar la identidad de estas bacterias a nivel de especie (Holt *et al.*, 2000). Esto se confirmó en la base de datos NCBI donde hubo un buen número de coincidencias de muy alto valor de similitudes entre la secuencia utilizada y las ya registradas.

Familia *Enterobacteriaceae*

Tanto *K. oxytoca* como *C. freundii* son especies que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, las cuales se caracterizan por ser bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas; se desarrollan bien a 37 °C y catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos. Asimismo, algunas especies de la familia Enterobacteriaceae producen gas, son oxidasa-negativas, catalasa-positivas y reductoras de nitratos (Holt *et al.*, 2000). Todas estas características son coincidentes con nuestros resultados, los que a continuación se describen a detalle:

Klebsiella oxytoca

La especie identificada como *K. oxytoca* mediante la tinción de Gram muestra ser bacilos Gram negativos; dentro de las pruebas bioquímicas da un resultado positivo para la utilización de citrato, acetoina y Gelatinasa. También muestran características distintivas de las demás bacterias como resultado positivo para lisina descarboxilasa, positivo para B-galactosidasa, positivas para la producción de indol que las separa de *Klebsiella pneumoniae* a nivel de especie y positivo para la utilización de todos los azúcares de las pruebas API 20e. Otras características distintivas son el resultado negativo para arginina descarboxilasa así como para la

producción de sulfuro de hidrógeno. Todas estas características son coincidentes con lo descrito para la especie por Holt *et al.* (2000), así como por Ainsworth *et al.* (2004), lo que ayuda a corroborar su identificación además de las pruebas moleculares.

Una de las características más sobresalientes de las colonias obtenidas de *K. oxytoca* y que no está descrita en la bibliografía es la manera iridiscente de reflejar la luz, algo que se puede encontrar en pocos tipos de colonias bacterianas (Carter *et al.*, 1984), siendo un mecanismo del que se sabe muy poco aunque se sugiere que es el resultado de un acomodo especial de la biopelícula de la colonia bacteriana (Kientz *et al.*, 2016). Este acomodo de la biopelícula se describe que es producido a través de triptófano en esta colonia bacteriana y que aunque no se pueda asegurar que sea el mismo mecanismo, puede sugerirse con base en sus características bioquímicas.

Dentro de las características que nos otorgan los medios selectivos es que pueden crecer en el medio sal y manitol, lo que significa que además de poder sobrevivir y desarrollarse en condiciones de altas concentraciones de sal, tiene la capacidad de fermentar manitol; esto se corroboró con las pruebas API 20e que se llevaron a cabo en el presente estudio y en la descripción general de la especie (Holt *et al.*, 2000). El manitol es un azúcar poliol que destaca por ser una fuente de carbono ampliamente utilizada por muchas especies de bacterias. Además de ser una fuente de carbono, el manitol es conocido por contribuir a la osmorregulación y a la tolerancia al estrés salino (Efiuvwevwere *et al.*, 1999; Khumar *et al.*, 2011).

Por otra parte, el medio MacConkey es ampliamente efectivo para identificar cualquier tipo de enterobacterias fermentadores de lactosa (MacConkey, 1908). El color rosado y rojo que se observa en las colonias que dan positivo para este agar se observa en bacterias en las cuales se ha comprobado que son positivas para la fermentación de lactosa a nivel genético (Sanath-Khumar *et al.*, 2011), como lo que sucede con *K. oxytoca*.

En el medio Salmonella Shigella hubo crecimiento y fue positivo para la fermentación de lactosa. Cabe resaltar que la lactosa es uno de los principales azúcares que se miden en los medios selectivos. La fermentación de este disacárido

es importante para la obtención de nutrientes a través de la glucosa. Existen dos factores principales que se refieren en la fermentación de lactosa por las enterobacterias: primero, el hecho de que una permeasa permite a la lactosa para entrar en la célula y segundo, la enzima β -galactosidasa ataca el enlace β -glicosídico de la lactosa para hidrolizarla a glucosa y galactosa (Lapage y Jayaraman, 1964). Esto permite sugerir que dicha colonia bacteriana posee ambas cualidades. Dentro de la prueba API 20e se pueden comprobar resultados positivos para β -galactosidasa en la galería ONPG. La utilización de citrato para estas colonias bacterianas es confirmada mediante las pruebas API 20e y en el medio citrato de Simmons, en los cuales dieron resultados positivos para la utilización de este compuesto, algo que es característico de esta especie (Holt *et al.*, 2000).

Citrobacter freundii

Las colonias identificadas son cocos Gram negativos. Dentro de los medios selectivos positivos para la utilización de citrato, positivos para la utilización de ornitina, enzima que participa en la regulación de la síntesis de ATP y ésta se puede presentar en condiciones anaerobias y aerobias (Thauter *et al.*, 1977), utilización de glucosa y azúcares simples dando positivo para manitol, inositol, sorbitol, ramnosa y arabinosa; negativo para la utilización de indol y la lisina descarboxilasa fue negativa. También pudo crecer en todos los medios selectivos, pudiéndose resaltar para fines de identificación el que son positivos en el crecimiento del medio sal y manitol, pudiendo fermentar este último, presento crecimiento positivo en el medio citrato de Simmons cuyo resultado es confirmando mediante las pruebas bioquímicas donde también fue positivo para citrato, Crecimiento en el medio hierro triple azúcar y demostrando que producen gas. Todas estas características son propias de la especie *C. freundii* según lo reportado por Holt *et al.*(2000), así como por González-Ardon *et al.* (1982) como características distintivas del género para la utilización de citrato y para la especie el resultado negativo para indol.

Comparando los resultados de las pruebas bioquímicas con el agar Hierro triple azúcar, es notable el hecho de que en este último se observan respuestas negativas para el uso de los azúcares, mientras que en las pruebas bioquímicas da positivo para la utilización de éstos, esto es debido a que *C. freundii* produce ácido

sulfhídrico (González-Ardon *et al.*, 1982), resultado que se confirma en este medio y se reporta que las bacterias que producen ácido sulfhídrico inhiben la fermentación de azúcares en el agar Hierro triple azúcar (Moats *et al.*, 1976).

CamGeBI3♀

Pueden crecer en el agar sal y manitol al igual que *K oxytoca* y *C. freundii*; sin embargo, CamGeBI3♀ no puede llevar a cabo la fermentación de manitol en este medio, ya que se ha visto que el operón de manitol es distinto en diferentes especies de bacterias (Sanath-Khumar *et al.*, 2011), lo que la diferencia de las otras dos colonias obtenidas en la cámara genital. No obstante, esto no quiere decir que no utilice esta azúcar, ya que en las pruebas API 20e sí da positivo a fermentación de manitol; esto puede ser debido a que el medio selectivo cuenta con muchos componentes, de los cuales algunos impiden el aprovechamiento del manitol.

En todos los demás medios, las colonias CamGeBI3♀ dan resultados negativos en crecimiento. Sin embargo, no se puede decir que no sean fermentadoras de azúcares o que no participen activamente en el ciclo de fermentación-oxidación, ya que en las pruebas API 20e se observa que pueden fermentar glucosa, manitol y sacarosa, los tres azúcares que son activos para la obtención de energía por el proceso mencionado anteriormente. Por lo tanto, sus estrategias para obtener energía son diferentes a las otras colonias bacterianas que se encuentran en la cámara genital. Esto significaría que tanto la activación del proceso como el proceso como tal es más específico, ya que muchos procesos celulares son inherentemente variables y esto puede conducir a la variación fenotípica sustancial que se produce independientemente de las diferencias genéticas o ambientales (Davidson *et al.*, 2008).

Un resultado en las pruebas bioquímicas para estas colonias y para Capgen♂ que se revisará en próximos estudios es el uso de piruvato para la producción de acetoína. La acetoína es compuesto volátil importante miembro de la familia del ácido C4-dicarboxílico que es definido como uno de los posibles treinta bloques principales de construcción químicos derivados de azúcares y funge como un almacén natural de energía en las funciones metabólicas (Werpy *et al.*, 2004); se obtiene como subproducto menor en la fermentación de ácido mixto en algunos

microorganismos (Li *et al.*, 2014). De hecho, entre una mayor cantidad de piruvato se produce una mayor cantidad de acetoína, pero el obtener bacterias que produzcan una cantidad grande de acetoína es muy raro.

Capgen♂

Presentan una morfología individual y colonial parecida a la de las bacterias aisladas del interior de la cámara genital, pero presentan diferencias importantes en cuanto a su metabolismo. En primera instancia, su crecimiento se ve inhibido en medios de altas concentraciones de sal, a diferencia de lo que sucede con las bacterias de la cámara, lo que permite sugerir que el entorno de la cápsula genital es diferente al de la cámara genital. Esto coincide con lo descrito para *Plusiotis costata* B. en donde la diferencia anatómica del aparato reproductor entre hembras y machos es evidente en estas dos estructuras (Morón *et al.*, 2010). También puede ser que simplemente una adaptación que no cuenta este tipo de bacterias para sobrevivir en estos medios. Otra característica es la producción de acetoína que comparten con las bacterias CamGeBI3♀ de la cámara genital.

Algunas bacterias que se localizan en estructuras de insectos no pueden crecer en condiciones de cultivo tradicionales, debido a que no presentan el entorno adecuado para su desarrollo (Zhang *et al.*, 2014). En cada resiembra el tamaño y número de colonias fueron disminuyendo hasta que no crecieron más en el medio, lo que para estudios posteriores se sugiere que se busque un medio que se más adecuado a las condiciones que esas bacterias necesitan y esto a su vez arrojaría posiblemente más información de las mismas sobre el medio en el cual se desarrollan.

En cuanto al empleo de azúcares en las pruebas bioquímicas, a pesar de dar negativo para todos los medios selectivos, las Capgen♂ resultaron positivas para el uso de glucosa y manitol; esto quiere decir que cuentan con el potencial para participar en otras estrategias de captación de glucosa (Nikolic *et al.*, 2013). La glucosa como principal azúcar simple para la obtención de energía se puede obtener a través de cinco diferentes rutas y puede metabolizarse de acuerdo a sus necesidades (Nikolic *et al.*, 2013).

8.2 Bacterias extraídas del intestino de machos y hembras de *Cyclocephala lunulata*

Se encontraron bacterias en el intestino de *C. lunulata* tanto de hembras como de machos, lo cual era algo esperado ya que desde hace tiempo se han aislado e identificado bacterias de la flora intestinal de coleópteros con la finalidad de estudiar su biodiversidad microbiana (Hunt y Borden, 1990; Zhang *et al.*, 2014). En las bacterias extraídas del intestino de *C. lunulata* se puede observar que hay diferentes tipos de morfología, siendo entre los más abundantes los bacilos, a diferencia de las del aparato reproductor en donde prevalecen los cocos. Pero la característica más importante es que hay una gran cantidad de bacterias que son Gram positivas. Todas las bacterias aisladas de la cámara genital fueron Gram negativas, lo que es una diferencia importante para separarlas con las del intestino. Dentro de los medios selectivos, estas bacterias pueden desarrollarse en el medio sal y manitol (característica que no comparten con las colonias CamGeBI3♀) y pueden fermentar el manitol (característica que no comparten con las colonias Capgen♂). En el medio MacConkey pueden desarrollarse y fermentar lactosa (característica que no comparten con las colonias CamGeBI3♀ y Capgen♂). Tuvieron crecimiento positivo en el medio Eosina azul de metileno; de igual manera que en el medio anterior, este crecimiento las separa de CamGeBI3♀ y Capgen♂ y no presentan una coloración verde metálico como *K. oxytoca*, lo que las separaría de estas colonias también.

En el medio Hierro triple azúcar, las bacterias intestinales presentaron un crecimiento positivo y se demuestra que son fermentadoras de azúcares; este resultado concuerda con la localización de las bacterias, ya que estas participan activamente en el proceso de alimentación de sus huéspedes y en el procesamiento de azúcares obtenidos por los alimentos. El medio Citrato de Simmons es un punto importante para eliminar la posibilidad de que las bacterias del intestino sean *K. oxytoca* o *C. freundii*, ya que las bacterias del intestino tuvieron un crecimiento negativo en este medio, por lo que no son capaces de utilizar citrato como fuente de carbono, característica esencial de las especies *K. oxytoca* y *C. freundii* para separarlas de otras especies de los mismos géneros.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se obtuvo evidencia suficiente para garantizar que las bacterias aisladas del intestino *C. lunulata* son completamente diferentes a las encontradas en la cámara genital.

8.3. Potencial químico-ecológico de las bacterias encontradas en aparatos reproductores de *Cyclocephala lunulata*

La identificación de microorganismos presentes en los aparatos reproductores de *C. lunulata* por sí misma resulta información novedosa para la familia Melolonthidae y sobre todo, para la especie en cuestión. Además de las diferentes vertientes que se desprenden de ello, tanto desde el enfoque taxonómico hasta aspectos sistemáticos y evolutivos, el eje rector del trabajo fue el abordar aspectos de la ecología química del modelo de estudio. El único antecedente sobre la comunicación química de integrantes de *Cyclocephala* se remonta a los reportes de Potter *et al.* (1980) en torno a una posible liberación de atrayentes sexuales y Leal (1998), en el cual atribuye la existencia de feromonas de agregación en especies de este género. En el caso de *C. lunulata*, la información en este sentido se restringe a algunos esbozos sobre su comportamiento precopulatorio y posibles sitios de producción de infoquímicos (Benítez-Herrera *et al.*, datos no publicados).

A diferencia de la mayoría de los trabajos relacionados con la asociación entre microorganismos y coleópteros, los cuales se concentran en describir la diversidad de estos en el intestino (Tagiliaba *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), las bacterias encontradas en el presente trabajo fueron localizadas en estructuras del aparato reproductor. Al ser localizadas en este sitio, puede ser que jueguen un papel preponderante en aspectos de reproducción de la especie. No es muy común el registro de microorganismos en insectos en esta zona, a pesar de que las bacterias son eficientes colonizadoras de los ecosistemas en los cuales existan condiciones favorables para su crecimiento y multiplicación (Madigan *et al.*, 2003).

En el caso de los melolóntidos, la búsqueda de microorganismos con un enfoque químico-ecológico se restringen al tradicional estudio con *C. zealandica* (Hoyt *et al.*, 1971); el caso de *C. lunulata* se adiciona al incipiente interés en especies distribuidas en México, como *P. ravidia* (Pérez-Estrada, 2016) y *M. nigripes* (Trujillo-

Vélez, 2017); en todos ellos se comparte la visión de buscar sitios alternativos en donde las hembras de estos insectos produzcan las sustancias involucradas en su comunicación química sexual. En este contexto, con las bacterias encontradas en *C. lunulata* se cuenta con argumentos que avalan la idea de producción de dichas sustancias. Con las colonias de *K. oxytoca* se observó que en el medio azul de metileno las colonias crecieron y presentan una coloración verde metálico, lo que indica que son positivas para la producción de ácido sulfúrico. En estudios previos se ha documentado la participación de algunos derivados de azufre producidos por *K. oxytoca* como atrayentes químicos en diversos grupos de insectos. Las bacterias de esta especie liberan compuestos como el sulfuro de dialquilio, el cual atrae a adultos de *Diadromus pulchellus* Wesmael (Thibout *et al.*, 1993; Thibout *et al.*, 1995). Se sabe también que el ácido sulfúrico es utilizado por bacterias para una mayor optimización en la fermentación de azúcares y para la obtención de productos de carbono, siendo el principal producto el etanol; además, con el uso de ácido sulfúrico como sustrato, en el proceso se liberan derivados del fenol (Gao *et al.*, 2014). El fenol ha sido registrado como componente de la feromona sexual de *C. zealandica*, atribuyéndose su producción a las bacterias encontradas en las glándulas accesorias (Hoyt *et al.*, 1971).

Para el medio Hierro tripe azúcar, la colonia bacteriana *K. oxytoca* puede fermentar una amplia cantidad de azúcares como glucosa, lactosa y sacarosa. Además de esto, produce gas, lo cual indica que muchas sustancias que utiliza para su metabolismo son volátiles; esto se confirma mediante la prueba API 20e. Comparándolo con los medios selectivos, las colonias de *K. oxytoca* pueden utilizar una gran cantidad de azúcares y alcoholes para la fermentación oxidativa como lo son el inositol, el sorbitol, la ramnosa, la sacarosa, la melobiosa la amigdalina y la arabinosa. Debido a esto se podría pensar que la cámara genital de *C. lunulata* tiene a su disposición algún tipo de azúcares. Esto comparado con las pruebas del medio azul de metileno donde se ve una producción de ácido sulfúrico para la fermentación de azúcares para la obtención de hexanos, así también como en la prueba API 20e se ve que puede utilizar el piruvato sódico para la producción de acetoína, la cual

participa en el almacenamiento del carbono y cuyo proceso libera también compuestos volátiles derivados de este (Xiao y Xu, 2007).

En las colonias bacterianas de *C. freundii*, la fermentación de sulfuro de hidrógeno se observa en el medio Salmonella Shigella y se comprueba en la prueba API 20e; se trata de un gas incoloro, flamable, lipofílico y se observa que participa en procesos de sulfhidratación (Kolluru *et al.*, 2014); además es soluble en agua con el olor característico a materia orgánica en descomposición (Wang, 2012); este olor se percibe en estas colonias bacterianas. El proceso de sulfhidratación es para el uso de azufre orgánico; si bien no se sabe si este está presente a primera mano en las cámaras genitales de *C. lunulata* o se presenta en algún momento del ciclo de oxidación, es el principal componente para la producción de ácido sulfhídrico por lo que debe estar disponible en algún momento o en alguna sustancia derivada o parecida. No es la primera vez que se menciona a *C. freundii* como partícipe en la atracción de un insecto. Robacker y Barlelt (1997) sugieren que *C. freundii* interviene en la liberación de 2-pentona, 3-metil-1-butamina y pirazina, la cual atrae a *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). Sin embargo, sí es la primera vez que se registra en la cámara genital de un coleóptero Melolonthidae. Cabe resalta que en el medio Hierro triple azúcar se confirma la producción de sulfuro de hidrógeno y que las colonias son capaces de liberar compuestos volátiles.

En el medio Citrato de Simmons se reporta de igual manera un crecimiento positivo de las bacterias *K. oxytoca* y *C. freundii*; el tipo de coloración azul que toma el medio indica que utilizan el carbono como fuente de energía, por lo que el citrato puede ser su fuente de carbono y las sales de amonio como fuente de nitrógeno para la fosforilación oxidativa en el ciclo del ácido tricarboxílico. Para la inducción del ciclo del ácido tricarboxílico se utiliza el oxígeno, el cual actúa como principal precursor para el ciclo; este podría ser obtenido por las bacterias al momento que la hembra expone su cámara genital al momento del “llamado sexual”, lo que es común observar en varias especies de los Melolonthidae (Romero-López *et al.*, 2009). De ser así esto, aunque no se sabe si en mayor o menor medida, las colonias bacterianas de *K. oxytoca* y *C. freundii* tienen un potencial en la producción de compuestos volátiles de esta naturaleza, debido a que al poder utilizar azúcares

para la obtención de compuestos derivados del carbono como hexano y compuestos derivados fenólicos mediante la utilización del citrato para fermentación oxidativa, coincide con la estructura de las feromonas integradas por estos compuestos, como es el caso de *C. lurida*, una especie del mismo género para la cual se reporta que uno de los compuestos principales que atrae a los machos y estimula la cópula son extractos hexánicos de los cuerpos de adultos y larvas de la misma especie (Haynes *et al.*, 1992). También los derivados de compuestos fenólicos están presentes en las feromonas de *Phyllophaga cuyabana* M. (Zarbin *et al.*, 2007) y *Holotrichia consanguínea* B. (Henzell *et al.*, 1970), ambos del grupo Melolonthidae.

Por lo analizado dentro de todas las pruebas efectuadas con las hembras y machos de *C. lunulata*, las colonias de *K. oxytoca* y *C. freundii* tienen un potencial para la producción de hexano, pero lo que hace especial a estas colonias es que también producen otros compuestos volátiles como el sulfuro de hidrógeno, el ácido sulfúrico y el azufre, este último pudiera estar involucrado en la biosíntesis de la feromona sexual de *Phyllophaga crinita* B. (Davis *et al.*, 2013; Robbins *et al.*, 2003).

Para las colonias CamGenBI♀ y CapGen♂ que no pudieron ser identificadas molecularmente, es difícil poder sugerir un papel que jueguen dentro de la comunicación química en esta especie. No obstante, ambas son productoras de acetoína por medio de la utilización de piruvato, lo que nos permite sugerir que utilizan un mecanismo de fermentación simple y son capaces de almacenar energía que puede o no interaccionar con las otras bacterias.

La existencia de todas las bacterias descritas en regiones específicas del aparato reproductor de ambos sexos de *C. lunulata* es un resultado inédito y brinda un avance significativo en el estudio de la comunicación química de los coleópteros Melolonthidae. No obstante, es indudable que se requiere de efectuar más pruebas que permitan registrar si pueden crecer otras colonias bacterianas que no se pudieron obtener en el medio LB, así como conocer en qué condiciones se encuentra cada colonia bacteriana dentro de las estructuras estudiadas para tener una idea del papel que desempeñan en la reproducción de estos insectos.

9. Conclusiones

1. Existen microorganismos dentro de la cámara genital de las hembras y en el interior de la cápsula genital de los machos de *C. lunulata*, los cuales presentan características microbiológicas, moleculares y bioquímicas diferentes entre ellas y a las que presentan los microorganismos encontrados en el intestino de ambos sexos.
2. Dos de las colonias bacterianas aisladas de la cámara genital fueron identificadas por ARNr 16S como *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii*.
3. *Klebsiella oxytoca*, *C. freundii* y CamGenBI♀ son candidatas para participar en la comunicación química de *C. lunulata*, por sus características bioquímicas y la posible producción de compuestos volátiles.

10. Literatura citada

- Ainsworth, R., 2004. Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems. IWA Publishing, Londres (Reino Unido), para la Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza).
- Anaya, A.L., Espinosa, F.J. y Cruz-Ortega, R. 2001. Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Editorial Plaza y Valdés, S.A. de C.V. 733 p.
- Andert, J., Marten A., Brandl, R. and Brune A. 2010 Inter and intraspecific comparison of the bacterial assemblages in the hindgut of humivorous scarab beetle larvae (*Pachnoda* spp.). FEMS Microbiology Ecology, 74. 439–449.
- Azambuja, P., E. S. Garcia, and N. A. Ratcliffe. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. Trends in Parasitology 21. 568–572.
- Ben-Dov, E., Shapiro, O. H., Siboni, N., and Kushmaro, A. 2006. Advantage of Using Inosine at the 3' Termini of 16S rRNA Gene Universal Primers for the Study of Microbial Diversity. Applied and Environmental Microbiology, 72. 6902–6906.
- Benítez-Herrera, L.N., M. Martínez y A.A. Romero-López. 2015. Anatomía del aparato reproductor de *macrodactylus mexicanus* (coleoptera: scarabaeoidea: melolonthidae) y su posible participación en su comunicación química sexual. Southwestern entomologist, 40(1). 189-198.
- Blomquist, G.J., Figueroa-teran R, Aw M, Song M, Gorzalski A, Abbott NL, Chang E, Tittiger C. 2010. Pheromone production in bark beetles. Insect Biochemistry Molecular Biology, 40.699–712.
- Brugerolle, G, Radek R. 2006. Symbiotic protozoa of termites. Soilily Biology 6. 243–269.
- Buchner, P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. John Wiley and Sons Interscience, New York, N.Y. 907.
- Burmeister, H. 1847. Lamellicornia Xylophila et Pectinicornia. Handbuch der Entomologie 5. 584.
- Campbell, B. C. 1990. On the Role of Microbial Symbiotes in Herbivorous Insects. Insect-Plant Interactions. E. A. Bernays. Boca Raton, CRC Press, Inc. 1: 164 pp.

- Carter, G. R. Genus I. *Pasteurella* Trevisan 1887, 94, AL Nom. Cons. Opin. 13, Jus. Comm. 1954, 153. (1984). En: Krieg, N. R.; Holt J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimor, MD. pp. 552–558.
- Cherman, M. A. y Morón, M. Á. 2014. Validación De La Familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana* 30. 201-220.
- Davidson, C.J., Surette M.G. 2008 Individuality in bacteria. *Annual Review Genetics*, 42. 253–268.
- Davis, T.S., Crippen, T.L., Hofstetter, R.W. and Tomberlin J. K. 2013. Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 30. 840-859.
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Menna, P., Bangel, E. V. and Hungria, M. 2012. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43. 698–710.
- Dicke, M. and M.W. Sabelis. 1988. Infochemical terminology: based on cost benefit analysis rather origin of compounds. *Functional ecology*, 2: 131-139.
- Dillon R.J. and Dillon V.M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49. 71-92.
- Dolinšek, J., Dorninger, C., Lagkouvardos, I., Wagner, M., and Daims, H. (2013). Depletion of Unwanted Nucleic Acid Templates by Selective Cleavage: LNAzymes, Catalytically Active Oligonucleotides Containing Locked Nucleic Acids, Open a New Window for Detecting Rare Microbial Community Members. *Applied and Environmental Microbiology* 79. 1534–1544.
- Domek, J.M. and D.T. Johnson. 1988. Demonstration of semiochemically induced aggregation in the Green June beetle, *Cotinis nitida* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environmental Entomology* 17. 147-149.
- Douglas, A.E. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23.38– 47.
- Douglas, A.E. 2011. Lessons from Studying Insect Symbioses. *Cell Host Microbe* 10. 359-367.

- Efiuvwevwere, B.J.O., Gorris L.G.M., Smid E.J. and Kets E.P.W. 1999 Mannitol enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51. 100–104.
- Gao, F., Yang, F., Zhou, H., Sun, Q., Zhang, Y., and Brown, M. A. 2014. Evaluation of Processing Technology for *Triarrhena sacchariflora* (Maxim.) Nakai for Ethanol Production. *PLoS ONE* 9, e114399.
- Gatesoupe F.J, Huelvan C., Bayon N.L., Delliou H. L., Madec L., Mouchel O., Quazuguel P., Mazurais D. and Zambonino-Infante J. L. 2016. The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories. *BMC Microbiology* 16. 1-13.
- Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155. 1–10.
- González-Ardon, O., Montes F., Mayorga A., y Letelier M. 1982. Infección Por *Citrobacter freundii*. *CidBimena* 9. 6-12.
- Hallett, R. H., A. L. Perez, G. Gries, R. Gries, H. D. Pierce Jr., J. Yue, A. C. Oehlschlager, L. M. González, and J. H. Borden. 1995. Aggregation pheromone of coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Chemical Ecology* 21. 1549-1570.
- Hansson, B., M.C. Larsson, and Leal W.S. 1999. Green leaf volatile-detecting olfactory receptor neurones display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. *Physiological Entomology* 24. 121-126.
- Harborne, J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Millennium Review* 18. 361-379.
- Haynes, K. F., Potter D. A. and Collins J. T. 1992. Attraction of male beetles to grubs: evidence for evolution of a sex pheromone from larval odor. *Journal of Chemical Ecology* 18. 1117–1124.
- Henzell, R.F. and Lowe M.D. 1970. Sex attractant of the grass grub beetle. *Science* 168. 1005-1006.
- Holt, J. G., Williams, L. and Wilkins. 2000. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Editorial Willian y Wilkins. 9na Edición.

- Hoyt, C.P., Osborne G.O., Mulcock A.P. 1971 Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature* 230. 472-473.
- Hunt, D.W. and Borden J.H. 1990 Conversion of verbenols to verbenone by yeast isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal Chemical Ecology* 16. 1385–1397.
- Hunt, T., Bergsten J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., St. John, O., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M. S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T. G., Bocakova, M., Bocak, L. and Vogler, A. P. 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318. 1913-1916.
- Indiragandhi, P., R. Anandham, M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, G. H. Kim, V. S. Saravanan, and T. Sa. 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *Journal of Applied Microbiology* 103. 2664–2675.
- Jameson, M. L. and Ratcliffe, B. C. 2002. Series Scarabaeiformia Crowson 1960 (Lamellicornia) Superfamily Scarabaeoidea Latreille 1802. Introduction, pp. 1-5. In: Arnett, R. H. Jr., M. C. Thomas, P. S. Skelley & J. H. Frank (Eds.). *American Beetles Volume 2. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea*. CRC Press, Boca Raton, 2. 881 p.p.
- Kientz B., Luke S., Vukusic P., Péteri R., Beaudry C., Renault T., Simon D., Mignot T. and Rosenfeld E. 2016. A unique self organization of bacterial sub-communities creates iridescence in *Cellulophaga lytica* colony biofilms. *Scientific reports* 6. 19906.
- Kim, J. Y. and Leal W. S. 1999. Eversible pheromone gland in a melolonthine beetle, *Holotrichia parallela*. *Journal Chemical Ecology* 25. 825-833.
- Kim, J.Y. and Leal W. S. 2000. Ultrastructure of pheromone-detecting sensillum placodeum of the Japanese beetle, *Popillia japonica* Newmann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Arthropod structure & development* 29. 121-128.

- King, A.B.S. 1984. Biology and identification of white grubs (Phyllophaga) of economic importance in Central America. *Tropical Pest Management* 30. 36-50.
- Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., and Kevil, C. G. 2013. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the nitric oxide society* 35. 5–20.
- Lapage, S. P. and Jayaraman, S. P. 1964. Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteria including salmonellae. *Journal of clinical Pathology* 17.117-121.
- Lawrence, J. F., Ślipiński, A., Seago, A. E., Thayer, M. K., Newton, A. F. and Marvaldi, A. E. 2011. Phylogeny of the Coleoptera Based on Morphological Characters of Adults and Larvae. *Annales Zoologici*, 61. 1-217.
- Leal, W.S. 1998. Chemical ecology of phytagous scarab beetles. *Annual Reviews of Entomology* 43. 39-61.
- Leal, W.S. 1999. Enantiomeric anosmia in scarab beetles. *Journal Chemical Ecology* 25. 1055-1066.
- Leal, W.S. and Mochizuki, F. 1993. Sex pheromone reception in the scarab beetle *Anomala cuprea*. *Naturwissenschafter* 280. 278-281.
- Leal, W.S., Zarbin P.H.G., Wojtasek H., Kuwahara S., Hasegawa M. and Ueda Y.. 1997. Medicinal alkaloid as a sex pheromone. *Nature* 385. 213.
- Li, S., Gao, X., Xu, N., Liu, L., and Chen, J. 2014. Enhancement of acetoin production in *Candida glabrata* by in silico-aided metabolic engineering. *Microbial Cell Factories* 13. 1-11.
- MacConkey A. T. 1908. Bile Salt Media and their advantages in some bacteriological examinations. *Journal of Hygiene* 8. 322-334.
- Madigan, M.T., Martinko J. M., y Brock, P.J. 2003. *Biología de los microorganismos*. Prentice-hall. Madrid. 750-758.
- Marçon J. R., Ribeiro R. A., Menna P., Bangel V. E. and Hungria M. 2012. Multilocus sequence analysis (Mlsa) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journ of Microbiology* 43. 698-710.

- Martinson, V. G., B. N. Danforth, R. L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek, and N. A. Moran. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology* 20. 619– 628.
- McCutcheon, J. P., B. R. McDonald, and N. A. Moran. 2009. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106. 15294–15399.
- Moats, W. A. and J. A. Kinner. 1976. Observations on Brilliant Green Agar with an H₂S Indicator. *Applied and Environmental Microbiology* 31. 380-384.
- Morales-Jimenez, J., Zuniga G., Villa-Tanaca L. and Hernandez-Rodriguez C. 2009. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology*, 58. 879–891.
- Morón, M. A. 1993. Observaciones comparativas sobre la morfología pupal de los Coleoptera Melolonthidae neotropicales. *Giornale Italiano di Entomologia*, 48. 249-255.
- Morón, M. A., Hernández-Rodriguez, S., y Ramírez-Campos, A. 1996. El complejo gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) asociado con la caña de azúcar en Nayarit, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 98. 1-44.
- Morón, M.A. 1986. El género *Phyllophaga* en México (Insecta: Coleoptera). Morfología, distribución y sistemática supraespecífica. Publicación 20. Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México.
- Morón, M.A. 2010. Observaciones sobre la reproducción y el ciclo vital de *Plusiotis costata* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae; Rutelinae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 26. 705-720
- Morón, M.A., Ratcliffe B.C., y Deloya C., 1997. Atlas de los escarabajos de México (Coleoptera: Lamellicornia) Volumen Uno. Familia Melolonthidae (subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiinae, Valginae y Melolonthinae). Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. y CONABIO, México. 280 pp. (ISBN-9680-7801-00-X)

- Murphy, K. M., D. S. Teakle, and I. C. Macrae. 1994. Kinetics of colonization of adult Queensland fruit-flies *Bactrocera tryoni* by dinitrogen-fixing alimentary-tract bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2508–2517.
- Neita, J. C. y Gaigl, A. 2008. Escarabajos de importancia agrícola en Colombia (Coleoptera: Scarabaeidae “Pleurosticti”). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá D.C. 160.
- Nikolic, N., Barner, T., and Ackermann, M. 2013. Analysis of fluorescent reporters indicates heterogeneity in glucose uptake and utilization in clonal bacterial populations. *Bmc microbiology* 13. 258.
- Ochieng, S.A., Robbins, P.S., Roelofs W.L. y Baker T.C. 2002. Sex pheromone reception in the scarab beetle *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95. 97-102.
- Piel, J. 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of Paederus beetles. *Proc. Natl. Academy Science USA* 99. 14002–14007.
- Pittman G.W. Brumbley S.M., Allsopp P.G. y O’Neill S.L. 2008 “Endomicrobia” and other bacteria associated with the hindgut of *Dermolepida albohirtum* larvae. *Applied Environmental Microbiology* 74. 762–767.
- Potter, D.A. 1980. Flight activity and sex attraction of northern and southern masked chafers in Kentucky turfgrass. *Anatomic. Entomological Society America* 73. 414-417.
- Price P.W., Denno R.F., Eubanks M.D., Finke D.L. y Kaplan L. 2011 *Insect ecology: behavior, populations, and communities*. Cambridge University Press, New York.
- Robacker D.C., and Bartelt R.J. 1997. Chemical attractive mexican fruit fly from *klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii* cultures sampled by solid-phase microextraction. *Journal Chemical Ecology* 23. 2897–2915.
- Robbins, P.S., Crocker R.L., Nojima S., Morris B.D., Roelofs W.L. and Villani MG. 2003. Methyl 2-(methylthio) benzoate: the unique sulfur-containing sex pheromone of *Phyllophaga crinita*. *Journal Insect Science* 11. 517–520.

- Robinson, C.J., Schloss P., Ramos Y., Raffa K. and Handelsman J. 2010. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial Ecology* 59. 199–211.
- Romero-López, A. A., Arzuffi R. y Morón M. A. 2005. Feromonas y atrayentes sexuales de coleópteros Melolonthidae de importancia agrícola. *Folia Entomológica Mexicana*, 44: 233-245.
- Romero-López, A. A. 2012. Uso de feromonas sexuales para el conocimiento y manejo de los “ensambles gallina ciega” en México. *Interciencia*. *Interciencia* 37. 559-564.
- Romero-López A. A., Arzuffi R, Morón MA. 2010a. Comunicación química sexual. En Rodríguez del Bosque LA, Morón MA (Eds.) *Plagas del Suelo*. 1ª edición Mundi Prensa. México. 83-96.
- Romero-López, A. A., R. Arzuffi, J. Valdez, E. Sánchez-Espíndola, and M. A. Morón. 2011. Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals Entomological Society* 104. 960-965.
- Romero-López, A.A. y L.N. Benítez-Herrera. 2014. Dimorfismo sexual en “melolóntidos” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) con mazas antenales mayores en machos que en hembras. *Entomología Mexicana* 13. 380-386.
- Romero-López, A.A. y R. Arzuffi. 2010. Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de la feromona sexual de un melolóntido mexicano. (pp. 204-222). In: Rodríguez del Bosque, L.A. y M.A. Morón (Eds.). *Ecología y control de plagas edafícolas*. Publicación especial del Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México.
- Romero-López, A.A., Arzuffi, R., J. ValdezMorón, M.A., Villalobos, F.J. and V. Castrejón-Gómez. 2004. Sensory organs in the antennae of *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae). *Annals of Entomological Society of America* 97. 1306-1312.
- Romero-López, A.A., M.A. Morón and J. Valdez. 2010b. Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravid*a Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Neotropical Entomology* 39. 957-966.

- Romero-López, A.A., R. Arzuffi, J. Valdez y M.A. Morón. 2009. Morfología y protrusión-retracción de la cámara genital femenina de *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 25. 315-321.
- Sanath-Kumar, K. P. 2011. Cloning and molecular analysis of a mannitol operon of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase (pts) type from *Vibrio cholerae* O395. *Archives of Microbiology* 193. 201-208.
- Scholtz, C. H. and Chown, S. L. 1995. The evolution of habitat use and diet in the Scarabaeoidea: a phylogenetic approach, pp. 355-374. In: J. Pakaluk & S. A. Slipinski (Eds.). *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Museum I Institut Zoologii PAN, Warszawa.
- Smith, A. B. T., Hawks, D. C. and Heraty, J. M. 2006. An overview of the classification and evolution of the major scarab beetle clades (Coleoptera: Scarabaeoidea) based on preliminary molecular analyses. *Coleopterists Society Monograph* 5. 35-46.
- Stechauner-Rohringer, R. 2010. Redescrición de inmaduros, ciclo de vida, distribución e importancia agrícola de *Cyclocephala lunulata* burmeister (coleóptera: melolonthidae: dynastinae) en Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural* 14. 203-220.
- Tada, S. and Leal W.S. 1997. Localization and morphology of the sex pheromone glands in scarab beetles (Coleoptera: Rutelinae, Melolonthinae). *Journal Chemical Ecology*, 23: 903-915.
- Tagliavia, N., Menssina E., Manachini B., Cappello S. and Quatrini P. 2014 The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC Microbiology* 30. 136-147.
- Thaochan, N., Drew, R. A. I., Hughes, J. M., Vijaysegaran, S., and Chinajariyawong, A. 2010. Alimentary Tract Bacteria Isolated and Identified with API-20E and Molecular Cloning Techniques from Australian Tropical Fruit Flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*. *Journal of Insect Science* 10, 131-147.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41. 100–180.

- Tillman, J.A. Seybold S.J. Russell A.J. and Blomquist G.J. 1999. Insect pheromones an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 29. 481–514.
- Wang, R. 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol rev.* 92. 791–896.
- Ward, A., C. Moore, V. Anitha, J. Wightman and D.J. Rogers. 2002. Identification of the sex pheromone of *Holotrichia reynaudi*. *Journal of Chemical Ecology* 28. 515-522.
- Werpy, T., Petersen G., Aden A., Bozell J., Holladay J, White J, Manheim A., Eliot d., Lasure I. y Jones S. 2004. Top value added chemicals from biomass. Volume 1- results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Dtic document 47. 1–77.
- Wertheim, B., van Baalen E.J.A., Dicke M. and Vet LEM 2005. Pheromonemediated aggregationin nonsocial arthropods. *Annual Review Entomology*, 50: 321–346.
- Wu, M., Sugimura Y., Iwata K., Takaya N, Takamatsu D., Kobayashi M., Taylor D., Kimura K. and Yoshiyama M. 2012. Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. *Journal of Insect Science* 14. 129-142.
- Xiao Z. and Xu P. 2007. Acetoin metabolism in bacteria. *Critical reviews in microbiology* 33. 127-140.
- Yarden, G. and Shani A. 1994. Evidence for volatile chemical attractants in the beetle *Maladera matrida* Argman (Coleoptera: Melolonthidae). *Journal of Chemical Ecology* 20. 2673-2685.
- Zarbin, A. P., Leal, W. S., Cre´bio B., vilac J. A. and Oliveirad, L. J. 2007. Identification of the sex pheromone of *Phyllophaga cuyabana* (Coleoptera: Melolonthidae). *Tetrahedron Letters* 48.1991–1992.
- Zhang, Z. Q., He, C., and Li, M. L. 2014. Analysis of Intestinal Bacterial Community Diversity of Adult *Dastarcus helophoroides*. *Journal of Insect Science* 14. 114.

Zhou, W., Nan X., Zheng Z., Wei C., and He H. 2015. Analysis of Inter Individual Bacterial Variation in Gut of Cicada *Meimuna mongolica* (Hemiptera: Cicadidae). *Journal of Insect Science*, 15: 131-136.

11. Anexos

Caldo Luria Bertani

Principio

La peptona de caseína y el extracto de levadura proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico.

Inocular el medio de cultivo con la muestra de ensayo. Incubar durante 24 h a 35°C. De los cultivos que muestran desarrollo, efectuar resiembras en medios de cultivo selectivos por estría cruzada.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Cloruro de sodio.....	5.0 gr
Extracto de levadura.....	5.0 gr
Peptona de caseína.....	10.0 gr

Preparación

Rehidratar 20 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 min. Conservaren refrigeración de 2° a 8°C.

Medios selectivos

Almacenamiento y vida útil

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los períodos de incubación recomendados. Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Medio Sal y manitol

Principios y explicación del procedimiento

El agar sal manitol en una fórmula diseñada por Chapman para la diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) de los

estafilococos negativos a la coagulasa. Este agar se utiliza para el aislamiento de estafilococos a partir de muestras clínicas, de cosméticos y de pruebas de límite microbiano.

El agar sal manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. La fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de estafilococos. Los estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *S. aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol.

Fórmula (en gramos por litro)

Extracto de carne.....	1.0
Peptona de carne.....	5.0
Tripteína.....	5.0
Manitol.....	10.0
Cloruro de sodio.....	75.0
Rojo de fenol.....	0.025
Agar.....	15.0

pH final: 7.4 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 111 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 min y calentar con agitación frecuente, llevando a ebullición durante 1 o 2 min para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 min. Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles.

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color beige rosado, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color rojo.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Siembra

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra por estría.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-24 hrs. Si a las 24 hrs. las placas presentan resultado negativo, incubar otras 24 h. La American Public Health Association (A.P.H.A) recomienda la incubación durante 3 días a 32 °C, en aerobiosis.

Interpretación de los resultados

Microorganismos fermentadores de manitol: colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo.

Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo-púrpura.

Medio MacConkey Agar

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Fórmula (en gramos por litro)

Peptona de carne.....	1.5
Peptona de gelatina.....	17.0
Tripteína.....	1.5
Lactosa.....	10.0
Mezcla de sales biliares N°3.....	1.5
Cloruro de Sódio.....	5.0
Rojo neutro.....	0.03
Cristal violeta.....	0.001

Agar.....13.5

pH final: 7.1 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 50 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color beige rosado, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color rojizo púrpura.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Siembra

En superficie: inocular directamente la muestra por estría.

En profundidad: inocular una alícuota de la muestra directa o de su dilución. Verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40-45°C. Homogeneizar mediante movimientos de vaivén y rotación. Dejar solidificar.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-48 hrs.

Interpretación de los resultados

Microorganismos fermentadores de lactosa: colonias rosadas rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar.

Microorganismos no fermentadores de lactosa: colonias del color del medio, incoloras

Materiales necesarios no provistos

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

Agar Eosina Azul de Metileno

Fundamento

El medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos.

Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; estos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante.

Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter* spp. presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

También, pueden crecer especies de *Candida* y se observan como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en *C. albicans*. *Enterococcus* spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* spp. y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Fórmula en gramos

Peptona.....	10.0
Lactosa.....	5.0
Sacarosa.....	5.0
Fosfato dipotásico.....	2.0
Eosina.....	0.4
Azul de metileno.....	0.065
Agar.....	13.5

pH final: 7.2 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 36 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 min. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 min.

Distribuir en placas Petri estériles.

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color púrpura, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color púrpura vinoso.

Nota: La esterilización del medio de cultivo reduce el azul de metileno al color naranja. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Siembra

En superficie, por estriado directo a partir de la muestra. En profundidad, para favorecer el desarrollo de clamidosporas.

Agar Salmonella Shigella

Fundamento

En el medio de cultivo la pluripeptona y el extracto de carne aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano.

Las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de S₂H que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro.

El rojo neutro es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. Salmonella, Shigella y otros microorganismos no

fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Fórmula (en gramos por litro)

Pluripeptona.....	5.0
Extracto de carne.....	5.0
Lactosa.....	10.0
Mezcla de sales biliares.....	8.5
Citrato de sodio.....	8.5
Tiosulfato de sodio.....	8.5
Citrato férrico.....	1.0
Verde brillante.....	0.00033
Rojo neutro.....	0.025
Agar.....	13.5

pH final: 7.0 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 60 g del polvo en 1L de agua purificada. Reposar 5 min y mezclar hasta homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 min para disolución total. No esterilizar en autoclave. Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles.

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color rosado, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color naranja ligeramente opalescente.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Siembra

Sembrar estriando directamente la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis a 35-37 °C durante 18-24 h.

Interpretación de los resultados

Microorganismos fermentadores de lactosa: colonias rosadas o rojizas.

Microorganismos no fermentadores de lactosa: colonias del color del medio, incoloras.

Microorganismos productores de sulfuro de hidrógeno: colonias con centro negro.

Agar Citrato de Simmons

Fundamento

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono.

Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino y el agar es el agente solidificante.

El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico.

El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Fórmula (en gramos por litro)

Citrato de sodio.....	2.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato dipotásico.....	1.0
Fosfato monoamónico.....	1.0
Sulfato de magnesio.....	0.2
Azul de bromotimol.....	0.08
Agar.....	15.0

pH final: 6.9 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 24,2 g del polvo en 1L de agua purificada. Dejar reposar 5 min. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 o 2 min para disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar y solidificar en posición inclinada (pico de flauta).

Características del producto

Medio de cultivo deshidratado: color amarillo-verdoso, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color verde.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Siembra

Estriar la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 24-72 hrs.

Algunos microorganismos pueden requerir hasta 7 días de incubación.

Interpretación de los resultados

- Positivo: crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.
- Negativo: ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

Agar Hierro Triple Azúcar

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Fórmula (en gramos por litro)

Extracto de carne.....	3.0
Pluripeptona.....	20.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Lactosa.....	10.0
Sacarosa.....	10.0
Glucosa.....	1.0
Sulfato de hierro y amonio.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.2
Rojo de fenol.....	0.025
Agar.....	13.0

pH FINAL: 7.3 ± 0.2

Instrucciones

Suspender 62,5 g del polvo en 1 l de agua purificada. Dejar reposar 5 min. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min hasta disolución total. Distribuir en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profundo.

Características Del Producto

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color rojo.

Almacenamiento

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Procedimiento

Siembra

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, con aguja de inoculación inocular el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37°C durante 18 a 24 h.

API 20 e

Principio

API 20 E es un sistema de identificación estandarizado para Enterobacteriaceae , Gram negativas que utilizan veintiún galerías bioquímicas miniaturizadas y una base de datos. Básicamente consta de veintiuna pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene veinte microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta. La prueba número veintiuno, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira.

Preparación

A partir de una colonia bien aislada del microorganismos en medio líquido LB, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (1% de cloruro de sodio) o 5 ml de agua estéril.

Cada pozo de la tira de veinte pruebas bioquímicas tiene un tubo y una cúpula, Se llena con la suspensión de bacterias los tubos, no la cúpula de todos los pocillos. Solo se llena la cúpula con la suspensión de las bacterias de los pozos CIT, VP y GEL.

Se cubre con parafina líquida las cúpulas de los pozos ADH, LDC, ODC, URE, H₂S, para obtener anaerobiosis.

Colocar agua estéril en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. Las tiras se ponen a incubar a 38 °C durante 24 h.

Para interpretar los resultados se colocan los siguientes reactivos:

TDA añadir una gota de cloruro férrico al 10 %; VP añadir una gota del reactivo 1 (hidróxido de potasio al 40%) y una gota del reactivo 2 (etanol); IND añadir una gota de reactivo de Kovacs o de dimetilamino-cinamaldehído y oxidasa; añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.