



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**“ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES
BACTERIANAS INTESTINALES AISLADAS DE LARVAS DE
HERMETIA ILLUCENS (ORDEN: DÍPTERA) ALIMENTADAS CON
DIFERENTES DIETAS”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTORA

Carrillo Torres Katherine Milagros

ASESORES

Dr. Sauvain Michel

Mg. Castillo Pareja Denis Helan

Blga. Sáez Flores Gloria María

JURADOS

Mg. Robles Román Margarita E.

Blga. Bravo Cruz Nora B.

Mg. Salas Asencios Ramsés

Mg. La Torre Acuy María I.

LIMA – PERU

2018

ÍNDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Generalidades.....	8
2.2.1. Insectos.....	8
2.2.2. Microbiota	10
2.2.3. Identificación	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.1. Mantenimiento del ciclo biológico y de la selección de larvas de <i>H. illucens</i>	21
3.2. Extracción del tubo digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	22
3.3. Aislamiento de cepas bacterianas	22
3.4. Identificación taxonómica de cepas.....	23
3.4.1. Cultivo microbiológico.....	23
3.4.2. Identificación molecular.....	28
3.5. Comparación de las comunidades bacterianas de las dos dietas	33
IV. RESULTADOS.....	34
4.1. Aislamiento de bacterias procedentes del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i> alimentadas con dos tipos de dietas	34
4.2. Caracterización de las bacterias aisladas.....	38
4.2.1. Caracterización morfológica macroscópica	39
4.2.2. Caracterización morfológica microscópica.....	40
4.2.3. Caracterización bioquímica	43
4.2.4. Caracterización enzimática.....	47
4.3. Identificación molecular	49
4.4. Determinación de la filogenia taxonómica de las bacterias aisladas	52
4.5. Comparación de las comunidades bacterianas entre la dieta N.º 1 y dieta N.º 2	55
V. DISCUSIÓN.....	58
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. RECOMENDACIONES.....	64
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis nutricional de la comida Alimento estándar y del guano	21
Tabla 2. Nomenclatura de las muestras de bacterias que fueron aisladas del intestino de las larvas.....	23
Tabla 3. Cepas de referencia de bacterias cultivadas para los controles de las pruebas.....	24
Tabla 4. Secuencias de los cebadores usados en las reacciones de amplificación del gen rRNA 16S.....	28
Tabla 5. Componentes del PCR para amplificación gen rRNA 16S.....	30
Tabla 6. Condiciones de ciclamiento para amplificación del gen rRNA 16S.....	31
Tabla 7. Listado de bacterias aisladas del tracto digestivo de las larvas de la dieta N.º 1	37
Tabla 8. Listado de bacterias aisladas del tracto digestivo de las larvas de la dieta N.º 2	37
Tabla 9. Características morfológicas macroscópicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 1	39
Tabla 10. Características morfológicas macroscópicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 2.	39
Tabla 11. Características microscópicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 1.	41
Tabla 12. Características microscópicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 2.....	42
Tabla 13. Características bioquímicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 1.....	45
Tabla 14. Características bioquímicas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 2.....	46
Tabla 15. Características enzimáticas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 1.....	47
Tabla 16. Características enzimáticas de los aislados bacterianos asociados a la dieta N.º 2.....	48
Tabla 17. Clasificación taxonómica de las cepas según la comparación de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de la dieta N.º 1.....	50
Tabla 18. Clasificación taxonómica de las cepas, según la comparación de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de la dieta N.º 2.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crianza de larvas con A: dieta N.º 1 Alimento estándar y B: dieta N.º 2 Guano de gallina	34
Figura 2. A: Larvas de 8 días; B: Larvas de 11 días alimentadas con dieta N.º 1 Alimento estándar	34
Figura 3. Estructura del sistema digestivo de larva de <i>Hermetia illucens</i> . A: Esófago. B: ciegos intestinales. C: tubos de Malpighi. Imagen del Laboratorio LMI-LAVI.	35
Figura 4. Cepas bacterianas obtenidas en diferentes diluciones. A: Dilución 10^{-1} del pool de intestinos. B: Dilución 10^{-2} . C: Dilución 10^{-3} . D: Dilución 10^{-4} . E: Dilución 10^{-5} . F: Dilución 10^{-6} . G: Control de diluyente.	36
Figura 5. Esquema de primers empleados para la amplificación y secuenciación de genes ribosomales para identificación molecular	49
Figura 6. Relación evolutiva de los taxones. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de la dieta N.º 1.	54
Figura 7. Relación evolutiva de los taxones. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de la dieta N.º 2.	55
Figura 8. Comunidad bacteriana. Porcentaje de los filos que están compuesto cada dieta.....	55
Figura 9. Comunidad bacteriana. Porcentaje de los géneros que están compuesto cada dieta.	57

RESUMEN

Existe poca información sobre la microbiota asociada con el tracto digestivo de insectos en especial con el insecto saprófago *Hermetia illucens*, aunque este insecto tiene mucha importancia para la degradación de desechos orgánicos, no se conoce la interacción con su microbiota. Se ha demostrado molecularmente la presencia de bacterias de diversos géneros en los diferentes estadios de su ciclo. Nuestro estudio tiene como objetivo comparar las comunidades bacterianas cultivables provenientes del tracto digestivo de larvas con dos diferentes dietas. Se realizaron ensayos bioquímicos para detectar y caracterizar las bacterias aisladas, y ensayos moleculares para la identificación de las bacterias mediante el secuenciamento del gen del ARNr 16S para construir un árbol filogenético que describa las comunidades bacterianas aisladas. En la dieta N.º 1 se aislaron 30 morfotipos y en la dieta N.º 2 se aislaron 38 morfotipos. Se encontraron bacterias distribuidas en 3 filos que son Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, incluyendo 18 géneros, que para la dieta N.º 1 fueron los géneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Proteus*, *Providencia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* y para la dieta N.º 2 fueron los géneros *Alcaligenes*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Ignatzschineria*, *Lysinibacillus*, *Morganella*, *Oceanobacillus*, *Paenalcaligenes*, *Paenibacillus*, *Providencia*, *Vagococcus*.

Palabras clave: *Hermetia illucens*, comparación, microbiota, enzimas.