



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE FENOLOXIDASA PRODUCIDA POR
BACTERIAS CULTIVABLES DEL INTESTINO DE *Acrobasis
nuxvorella* RELACIONADAS CON EL CATABOLISMO DE
FENOLES**

Por:

Frida Susana Leal Zayas

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito para obtener el grado de:

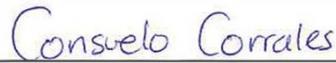
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité de tesis designado para la revisión de la tesis de Frida Susana Leal Zayas la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aprobada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro
Directora de Tesis



Dra. Consuelo Gpe. Corrales Maldonado
Integrante del comité de tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Evaluación de Fenoloxidasa Producida por Bacterias Cultivables del Intestino de *Acrobasis mixvorella* Relacionadas con el Catabolismo de Fenoles" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Frida Susana Leal Zayas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo financiero a este proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por el sustento y abrirme sus puertas.

Un particular agradecimiento a la Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, titular del laboratorio de Ecología Química por compartir sus conocimientos, por su dedicación y confiar en mí. Del mismo modo, estoy muy agradecida con la Dra. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado por sus enseñanzas, orientación y paciencia y con la M. C. Rosalva Pérez Morales por todo el apoyo técnico brindado con las técnicas de microbiología. Al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por permitirme trabajar en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal y por su guía, así mismo al personal que labora en dicho laboratorio, Francisco y Emmanuel por resolver las dudas que se me presentaron. A la Dra. Gabriela Ramos Clamont Monfort por su asesoría y accesibilidad.

Así mismo, agradezco a mis compañeros de generación, Oneyda, Eileen, Stephany y compañeros de laboratorio, Laura y Ezequiel por estar presentes en cada etapa y de alguna manera ser partícipes en mí desarrollo en ambos laboratorios. Dios los bendiga a todos.

DEDICATORIA

A mi esposo Fernando, quien siempre me brinda su apoyo y me impulsa a lograr las metas que me propongo, además por ser mi amigo, confidente y compañero.

A mis papás, Rosa y Miguel Ángel con todo mi amor.

A mis hermanas Rosa Guadalupe, Ángela, Jazmín y mi hermano Ángel, son parte de mi motivación para crecer profesionalmente y ser mejor persona.

A mis sobrinos, Iker, Sofía y Ángel, presentes siempre en mí.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Relación de <i>Acrobasis nuxvorella</i> - <i>Carya Illioninensis</i>	12
2.2 Características de <i>Cayra Illinoensis</i> como Alimento de <i>Acrobasis nuxvorella</i>	13
2.3 Simbiontes Intestinales en Insectos	16
2.3.1 Simbiontes Productores de Nutrientes	16
2.3.2 Simbiontes Productores de Metabolitos Defensivos	17
2.3.3 Simbiontes Productores de Enzimas	17
2.4 Enzimas Catabolizadoras de Metabolitos en Plantas.....	18
2.5 Multicobre Oxidasas.....	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo General.....	21
4.2 Objetivos Específicos	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Material Biológico.....	22
5.2 Pruebas Bioquímicas a Aislados del Intestino de <i>A. nuxvorella</i>	22
5.3 Selección de Aislados con Fenoloxidasa.....	23
5.4 Cuantificación de Actividad Fenoloxidasa.....	24
5.5 Identificación de Aislados con Actividad Fenoloxidasa	24
5.6 Análisis Estadístico	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1 Reactivación de Aislados de <i>Acrobasis nuxvorella</i>	26
6.2 Pruebas Bioquímicas de Aislados del Intestino de <i>A. nuxvorella</i>	26
6.3 Ensayo de Tamizaje de Actividad Fenoloxidasa en Aislados Bacterianos.....	27
6.4 Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa.....	29
6.5 Identificación de Aislados Positivos a Actividad Fenoloxidasa.....	30

CONTENIDO (continuación)

7. CONCLUSIÓN.....32
8. REFERENCIAS33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de Vida de <i>Acrobasis nuxvorella</i>	15
2. Daño Producido por <i>Acrobasis nuxvorella</i> en las Nuececillas en Diferentes Etapas del Desarrollo	16
3. A) <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (control positivo), B) Aislado 66 Fenoloxidasa Positivo.....	30
4. Actividad Fenoloxidasa Producida por los Aislados Bacterianos Intestinales.....	31

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Caracterización Mediante Pruebas Bioquímicas de Aislados de Bacterias Intestinales.....	28
2. Aislados Bacterianos que Presentaron un Resultado Positivo de Producción de Enzima Fenoloxidasa en Ensayo de Tamizaje.....	29
3. Resultado de la Identificación de los Aislados Positivos a la Actividad Fenoloxidasa..	32

RESUMEN

Acrobasis nuxvorella (Lepidoptera: Pyralidae) mejor conocido como gusano barrenador de la nuez (GBN) es un insecto plaga de *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch o nogal pecanero. Ocasiona pérdidas considerables al cultivo de nuez pecana el cual es muy importante en México. Este insecto se adaptó al nogal pecanero a pesar de su alto contenido en compuestos fenólicos. En este trabajo hipotetizamos que, en su evolución, el insecto se adaptó al nogal pecanero asociándose simbióticamente con bacterias intestinales productoras de la enzima fenoloxidasa, para catabolizar los compuestos fenólicos presentes en su alimento. Se reactivó un grupo de 178 aislados de bacterias obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación. Del intestino de larvas del GBN, se realizó una prueba cualitativa de actividad fenoloxidasa en placas Petri donde se obtuvieron 9 aislados positivos. Posteriormente se cuantificó la actividad fenoloxidasa en un espectrofotómetro obteniéndose actividades en un rango de 0.8 a 3.5 U/ μ g de proteína. El aislado que presentó la menor actividad fue etiquetado como 30 y el de la mayor, como 31. Se realizó la identificación de los aislados mediante el uso del gen RNA 16S, encontrando que los aislados corresponden a diferentes especies de *Bacillus*, siendo las cepas 24, 66 y 29: *Bacillus pumilus*, las cepas 65, 62, 28 y 23 *Bacillus safensis*, 30: *Bacillus altitudinis* y 31: *Bacillus xiamenensis*. Estas especies de *Bacillus* se han reportado con actividad de enzimas multicobre oxidasas. Sin embargo, es la primera vez que se reporta su actividad fenoloxidasa. En conclusión, las larvas de GBN contiene bacterias intestinales productoras de la enzima fenoloxidasa que podrían estar capacitando al insecto en la catabolización de los compuestos fenólicos presentes en su dieta.

Palabras claves: *Enzima, compuestos fenólicos, bacterias intestinales, bacillus.*

ABSTRACT

Acrobasis nuxvorella better known as GBN is an insect pest of *Carya illinoensis* or pecan nut, causing losses to the pecan nut crop that is very important in Mexico, this insect was adapted to the pecan nut even though it produces phenolic compounds in high concentrations. In this study we hypothesize that GBN in its evolution was adapted to the pecan nut by associating symbiotically with gut bacteria producing the enzyme phenoloxidase to catabolize the phenolic compounds present in its food. A group of 178 isolates of bacteria from the gut of the *A. nuxvorella* larvae obtained in a previous work of the laboratory was reactivated, a qualitative test of phenoloxidase activity in Petri dish was carried out where a total of 9 positive isolates were obtained. Subsequently, the phenoloxidase activity was quantified in a spectrophotometer, obtaining activities in a range of 0.8 to 3.5 U/ μ g of protein. The isolate that presented the lowest activity was the named 30 and the highest was 31. The identification of the isolates was carried out by using the RNA 16S gene sequencing, finding that the isolates correspond to different species of *Bacillus*, being the strains 24, 66 and 29: *Bacillus pumilus*, the strains 65, 62, 28 and 23 *Bacillus safensis*, 30: *Bacillus altitudinis* and 31: *Bacillus xiamenensis*. These *Bacillus* species have previously been reported with multicopper oxidase enzyme activity; however, this is the first time their phenoloxidase activity has been reported. In conclusion, GBN larvae contains intestinal bacteria producing the enzyme phenoloxidase that could be enabling the insect in catabolization of phenolic compounds present in its diet.

Key words: *Enzyme, phenolic compounds, intestinal bacteria, bacillus.*

1. INTRODUCCIÓN

Acrobasis nuxvorella (Lepidoptera: Pyralidae) o Gusano Barrenador de la Nuez (GBN) es un insecto Lepidóptero monófago de *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch o nogal pecanero. El cultivo de nogal pecanero es de importancia económica en varios estados de México incluyendo a Sonora. Las plantas para defenderse del ataque de las plagas han desarrollado sistemas de defensa como la producción de metabolitos disuasivos de la alimentación. Para el caso del nogal pecanero, la estrategia evolutiva ha sido producir altas concentraciones de compuestos fenólicos: estos compuestos, podrían actuar como mecanismo de defensa de la planta, produciendo daños en el intestino de los insectos, impidiendo que la planta continúe siendo consumida. Por otro lado, los insectos herbívoros han evolucionado, adaptándose a las defensas de la planta, estableciendo relaciones simbióticas con su microbiota intestinal, las cuales los capacitan para sobrevivir al ataque de las plantas. Se presume que esta simbiosis permite la degradación de los compuestos fenólicos de la planta catabolizada por enzimas específicas presentes en algunas especies del microbioma, inactivando así, su efecto dañino hacia el insecto (Rasiravuthanahalli *et al.*, 2017). La planta del nogal pecanero produce taninos, compuestos fenólicos que podrían llegar a intoxicar a las larvas del gusano barrenador de la nuez. Sin embargo, esto no ocurre, aun cuando las larvas consumen el follaje de la planta. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que los simbiosis intestinales del gusano barrenador de la nuez producen la enzima tanasa para hidrolizar los taninos (Corrales -Maldonado *et al.*, 2022). La acción de dicha enzima produce la liberación de altas concentraciones de ácido gálico, el cual, también podría ejercer un efecto tóxico sobre el insecto. La capacidad reproductiva del insecto como plaga del nogal pecanero (Corella-Madueño *et al.*, 2011), es indicio de que esto no ocurre, por lo que puede suponerse que los simbiosis intestinales del GBN producen enzimas que catabolizan las altas concentraciones de ácido gálico liberado. Dentro de las enzimas que ejercen su actividad sobre los compuestos fenólicos se encuentran las multicobre oxidadas; entre ellas las polifenoloxidasas. Por lo anterior, hipotetizamos que *Acrobasis nuxvorella* se evade algunas de las defensas del nogal pecanero asociándose con bacterias simbiosis productoras de la enzima fenoloxidasa que lo capacitarían a catabolizar los compuestos fenólicos, para demostrar esta hipótesis planteamos como objetivo general de este trabajo identificar en la microbiota del intestino de larvas de *Acrobasis nuxvorella* bacterias productoras de la enzima fenoloxidasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Relación *Acrobasis Nuxvorella-Carya Illinoensis*

Acrobasis nuxvorella (Lepidoptera: Pyralidae), es una de las plagas más importantes de *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch o nogal pecanero. Esta plaga tiene su origen en la región que divide al sur de Estados Unidos de América y al norte de México. Históricamente ha sido un problema importante para las zonas productoras americanas, desde el centro de Texas y Oklahoma hacia el este, hasta el oeste de Mississippi, hacia el norte a lo largo del valle del río Mississippi hasta Missouri, Illinois y el sur de Ohio (Knutson y Ree, 2019). En México se extiende por el norte y centro de la República produciendo pérdidas considerables en los estados productores de nuez de Chihuahua, Sonora, Durango y Nuevo León y a otros pequeños productores de Coahuila y de la zona comprendida entre Guanajuato e Hidalgo (Harris *et al.*, 2008). En los estados productores mexicanos, el GBN causa pérdidas hasta del 40 % de la producción, si no se controla mediante la aplicación de insecticidas o con el uso de enemigos naturales (Corella-Madueño *et al.*, 2012; Fu-Castillo *et al.*, 2013). Entre los agentes químicos utilizados para el control de GBN se encuentran los insecticidas de diacilhidracina metoxifenoza y tebufenoza, tóxicos principalmente para las larvas de lepidópteros. En cuanto al control biológico, las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* son tóxicas solo para las larvas de lepidópteros, pero debido a su corta persistencia en condiciones de huerto no se usan en huertos comerciales. También se ha tratado de establecer controles utilizando feromonas o avispas y moscas parásitas. A pesar de los diversos controles implementados el GBN se sigue extendiendo, tanto en México como en Estados Unidos de América. Se supone que el movimiento y el comercio de árboles de vivero infestados y yemas para injertos es el principal medio de transmisión del gusano (Kutson y Ree, 2019).

El GBN es un insecto Lepidóptero, monófago ya que se alimenta exclusivamente del nogal pecanero; es holometábolo, lo que significa que lleva a cabo una metamorfosis en todas las etapas de desarrollo, pasando por huevo, larva, pupa y adulto. Además, es multivoltino, llevando a cabo aproximadamente 4 generaciones durante la etapa reproductiva de la planta del nogal pecanero (Fu-Castillo *et al.*, 2010). Este insecto ha co-evolucionado con *Carya illinoensis* acoplado su

ciclo de vida a la fenología del nogal pecanero. Cuando el nogal pierde las hojas en el otoño, por ser caducifolio, el insecto teje un capullo con sus propias heces y con seda que el mismo produce y pasa el invierno dentro del capullo en forma de larva (Kutson y Ree, 2019). Una vez que llega la primavera y el árbol brota, el insecto percibe la señal química de que hay alimento disponible y sale a alimentarse de brotes tiernos y de pequeñas nuececillas inmaduras (Corella-Madueño *et al.*, 2011). La larva barrena la nuez y dentro de ella pupa y se convierte en adulto, para posteriormente copular y ovipositar, para dar origen a la primera generación (Corella-Madueño *et al.*, 2012) (Figura 1). Ésta resulta ser la generación de gusanos que más daño ocasiona al cultivo, debido a que coincide con las nuececillas de tamaño muy pequeño, cuya cáscara aún no se encuentra lignificada y por tanto son más vulnerables para ser consumidas por la larva. Está reportado que una sola larva puede llegar a consumir un racimo completo de nuececillas. Es por ello que el control de la plaga es muy importante cuando se presenta la primera generación (Fu-Castillo *et al.*, 2010). Ubicar nuececillas dañadas es una tarea sencilla ya que el insecto forma un tapón con sus propias heces aglomeradas con hilos de seda. Además, las nuececillas dañadas toman una coloración café, dando una apariencia característica y reconocible de daño por esta plaga (Figura 2).

2.2 Características de *Carya illinoensis* como Alimento de *Acrobasis nuxvorella*

Carya illinoensis es una planta caducifolia que pierde sus hojas en el otoño, para posteriormente entrar en dormancia durante el invierno, manteniendo su metabolismo al mínimo durante los meses de noviembre a marzo (Crosa *et al.*, 2023). Por su parte *Acrobasis nuxvorella* en su evolución se adaptó a este receso metabólico y para pasar el invierno las larvas construyen un capullo que le sirve de protección durante el invierno. Al inicio de la primavera, donde la planta de nogal reanuda su metabolismo, empezando con la brotación, el insecto percibe este crecimiento vegetativo que le indican que al exterior del capullo hay alimento, con lo cual rompe la diapausa o receso invernal (Vargas-Arispuro *et al.*, 2013). Para consumir las nuececillas, las larvas de *Acrobasis nuxvorella* barrena la cáscara no lignificada de la nuececilla, introduciéndose con facilidad ya que esta es muy tierna.



Figura 1. Ciclo de vida de *Acrobasis nuxvorella* como insecto holometábolo pasa por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto (Corella-Madueño *et al.*, 2012).

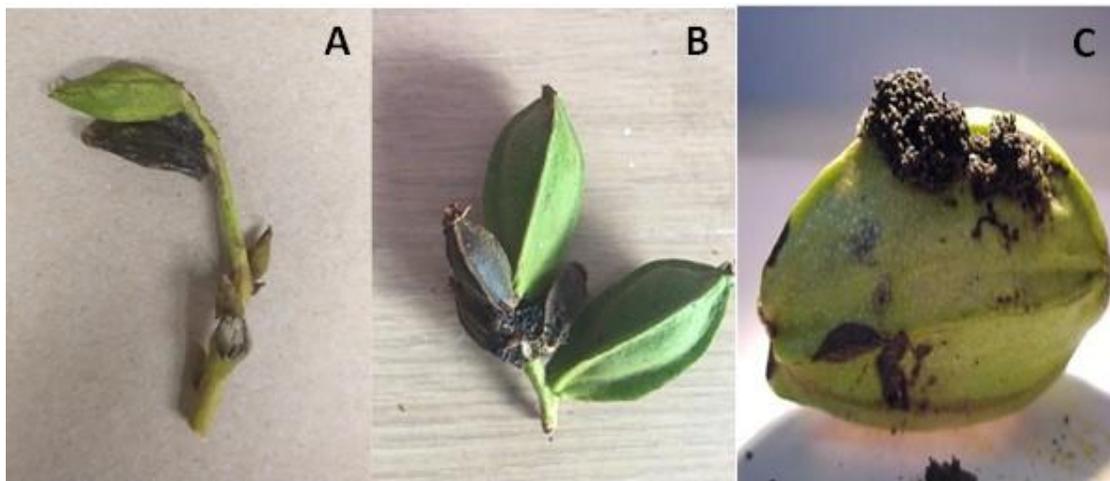


Figura 2. Daño producido por *Acrobasis nuxvorella* en las nuececillas en diferentes etapas del desarrollo. **A.** La primera generación daña nuececillas tiernas, **B.** Daño por la segunda generación a nueces más desarrolladas y **C.** La tercera generación daña nueces más cercanas a la madurez.

Dentro de esta nuececilla y cuando su estado larval es el requerido, puede llegar a pupar para posteriormente emerger en forma de palomilla o imago. Por su parte, *Carya illinoensis* para defenderse del ataque de los herbívoros produce moléculas disuasorias como son los compuestos fenólicos. En específico, el nogal pecanero es rico en taninos condensados e hidrolizables, los

cuales en altas concentraciones forman complejos con las proteínas disminuyendo su disponibilidad y pueden ocasionar efectos tóxicos en el metabolismo de los animales o insectos que los consumen (Yuan *et al.*, 2020). Cuando estos taninos se hidrolizan se genera como producto de la hidrólisis: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido elágico y derivados del ácido elágico entre otras moléculas, según lo revisado por Sharma en el 2019 en algunos casos se pierden los efectos tóxicos con la hidrólisis de los taninos (Sharma, 2019). Es importante resaltar que las altas concentraciones de taninos no afectan al GBN, por lo que se presume que algún factor lo puede estar protegiendo. En una investigación reciente realizada en nuestro grupo de trabajo, se observó que el crecimiento de las larvas del GBN es asistido por bacterias simbiotes intestinales productoras de la enzima tanasa (tanino acil hidrolasa E.C. 3.1.1.20), la cual puede hidrolizar estos compuestos, liberando ácido gálico en altas concentraciones (Corrales-Maldonado *et al.*, 2022).

2.3 Simbiontes Intestinales en Insectos

En sus procesos evolutivos y adaptativos, los insectos se han ido asociando con microorganismos que los asisten para obtener aquello que no son capaces de producir por sí mismos o que no obtienen de la dieta. Estos microorganismos producen una serie de metabolitos que mejoran el metabolismo, la reproducción y la respuesta inmune del hospedero, entre otros (Ottaviani *et al.*, 2011). Entre los microorganismos más reportados en asociaciones simbióticas encontramos a los hongos, levaduras, bacterias, virus, protozoarios y arqueas (Zhao *et al.*, 2022). Por ejemplo, los áfidos, se alimentan de la savia de las plantas, que es rica en carbohidratos, sin embargo, es pobre en vitaminas y aminoácidos, estos insectos en particular son asistidos por la bacteria *Buchnera aphidicola* que produce para ellos vitaminas del complejo B (Blow *et al.*, 2020).

La simbiosis que establecen los insectos con las bacterias puede ser de dos tipos: primaria, que es cuando la bacteria produce un metabolito indispensable para la sobrevivencia del insecto, por lo cual el insecto no sobrevive sin la bacteria. Se le llama secundaria o facultativa, a la simbiosis en la cual el insecto puede sobrevivir sin la bacteria, sin embargo, en condiciones no óptimas (Ottaviani *et al.*, 2011). Los estudios de simbiosis más amplios que se han realizado en insectos recaen en tres áreas principales que son: simbiosis nutricional, de protección contra patógenos y

productoras de enzimas y en la mayoría de los casos se han realizado en insectos modelo como *Bombyx mori* que es un Lepidóptero modelo para el estudio de la fisiología de este grupo de insectos (Zhang *et al.*, 2022) o en plagas importantes como son las termitas (Scharf y Peterson, 2021).

2.3.1 Simbiontes Productores de Nutrientes

Los insectos son incapaces de producir por sí mismos muchos de los nutrimentos esenciales para su desarrollo (Blow *et al.*, 2020). Los insectos que se alimentan de dietas muy específicas, o que son monófago, no obtienen todos los nutrientes que necesitan de su dieta por lo que requieren de suplementar los nutrientes deficientes de su dieta y es ahí donde los simbiontes juegan un papel muy importante al aportar al insecto los elementos nutricionales que no obtiene de su dieta aportando algunas enzimas que les ayudan a metabolizar su fuente de energía (MsangoSoko *et al.*, 2021). Un ejemplo son los insectos que se alimentan de madera, son asistidos por sus simbiontes con el aporte de enzimas celulasas que les ayudan a metabolizar su fuente de energía (MsangoSoko *et al.*, 2021). En el caso de los áfidos la simbiosis nutricional con *Buchnera aphidicola*, y *Wolbachia* spp las cuales les aportan vitaminas del complejo B (Blow *et al.*, 2020). Específicamente, las especies *Wolbachia* sintetizan las vitaminas biotina y riboflavina demostrado en saltamontes [*Laodelphax striatellus* (Fallén), y *Nilaparvata lugens* (Stål)] (Ju *et al.*, 2020).

2.3.2 Simbiontes Productores de Metabolitos Defensivos

Los insectos por ellos mismos han desarrollado la capacidad de defenderse de sus enemigos naturales como depredadores o patógenos, sin embargo, también son asistidos por bacterias simbiontes produciendo metabolitos defensivos (Van Moll *et al.*, 2021). La industria de producción de fármacos ha encontrado en los simbiontes de los insectos, una fuente de producción de compuestos que son medicamentos para consumo humano, por ejemplo: el género de bacterias

Streptomyces produce una serie de metabolitos que han sido usados como antibióticos en humanos como, por ejemplo: los β -lactámicos, macrólidos, glucopéptidos estos fueron aislados principalmente de *Streptomyces* (Kumar *et al.*, 2022). Con el incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, recientemente se realizó un estudio sobre la presencia de *Streptomyces* en 2580 microbiomas de insectos para ser utilizados como una fuente potencial de nuevos compuestos antibióticos, encontrando la presencia de *Streptomyces* en el 56% de las especies de insectos de 13 órdenes, se obtuvieron en total 10, 178 aislados, correspondiendo 1326 al orden Lepidóptera (Chevrette *et al.*, 2019).

2.3.3 Simbiontes Productores de Enzimas

Se ha atribuido que la adaptabilidad de los insectos a los diferentes ecosistemas en los que se encuentran se debe a la asistencia que reciben de sus simbiontes (Jing *et al.*, 2020). Las bacterias intestinales que se han adaptado al insecto producen enzimas que les ayudan a metabolizar lo que reciben en su dieta, muchos de ellos son herbívoros que su dieta es rica en celulosa, lignocelulosa, xilanasas, pectinasas, entre otros carbohidratos complejos siendo recalcitrantes o de difícil digestión (Berasategui *et al.*, 2016).

2.4 Enzimas Catabolizadoras de Metabolitos en Plantas

La materia de la que se alimentan los insectos, en muchos casos son moléculas complejas para las cuales, los insectos no tienen herramientas químicas o bioquímicas para metabolizarlas, casos de ejemplo son la celulosa, la lignina, los taninos, siendo en estos casos donde los insectos reciben asistencia de los simbiontes, los cuales producen aquellas enzimas que van a hidrolizar las moléculas poliméricas complejas en monómeros, algunas de las enzimas que se han reportado que son producidas por simbiontes en el intestino de insectos son: Celulasas, lignocelulasas y xilanasas, entre muchas hidrolasas más (Danso *et al.*, 2022). Cuando las enzimas actúan para

hidrolizar los biopolímeros presentes en la dieta de los insectos, comúnmente se liberan altas concentraciones de compuestos fenólicos que son susceptibles de ser oxidados por las enzimas multicobreoxidasas como la polifenoloxidasas.

2.5 Multicobre Oxidasas

Las multicobre oxidasas es un grupo de enzimas que lleva a cabo algunos procesos oxidativos en el metabolismo de los organismos (Valles *et al.*, 2020). Estas enzimas participan en muchas actividades metabólicas como pigmentación, síntesis y degradación de lignina, entre otras (Wu *et al.*, 2015). En este grupo se encuentran tirosinasas, fenol oxidasas y lacasas (Dittmer y Kanost, 2010). En particular las fenoloxidasas en los insectos tiene la capacidad de detoxificar los compuestos fenólicos que se encuentran en exceso, evitando un daño por toxicidad (Wu *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que las enzimas multicobre oxidasas son producidas por algunas bacterias como: *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Claus, 2004; Singh *et al.*, 2011). A su vez, se ha demostrado la presencia de estas bacterias como parte de la microbiota intestinal de diversos insectos (Paniagua-Voirol *et al.*, 2018), estos antecedentes nos han llevado a hipotetizar que los simbiosis intestinales de larvas de *Acrobasis nuxvorella* son capaces de producir fenol oxidasas que mediante una oxidación de compuestos fenólicos capacita a las larvas consumir como único alimento a *Carya illinoensis*.

3. HIPÓTESIS

Las larvas de *Acrobasis nuxvorella* contiene bacterias intestinales que producen fenoloxidasa las cuales le permiten alimentarse del nogal pecanero.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar en la microbiota del intestino de larvas de *Acrobasis nuxvorella* bacterias productoras de la enzima fenoloxidasa.

4.2 Objetivos Específicos

1. Reactivar y realizar pruebas bioquímicas a aislados de bacterias intestinales de larvas de *A. nuxvorella*.
2. Determinar cualitativamente actividad fenoloxidasa en aislados bacterianos contenidos en el intestino de larvas de *A. nuxvorella*.
3. Determinar cuantitativamente fenoloxidasa en los aislados del intestino de larvas de *A. nuxvorella*.
4. Identificar las bacterias aisladas que producen fenoloxidasa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

Los aislados bacterianos que se utilizaron para este trabajo, fueron previamente obtenidos del intestino de larvas de *A. nuxvorella*. Las larvas fueron extraídas de nueces inmaduras, infestadas en huertos de nogal pecanero ubicados en Camargo, Chihuahua en 2019. Para este estudio se utilizaron 178 aislados bacterianos, los cuales estuvieron preservados a -80°C en un ultra congelador (NuAire) en caldo de soya tripticaseína (TSB marca BD) en viales con glicerol al 80%.

5.2 Pruebas Bioquímicas a Aislados del Intestino de *A. nuxvorella*

Se realizaron pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa y tinción de Gram) a los aislados bacterianos (Fernández *et al.*, 2010). La prueba oxidasa se realizó colocando cada muestra con un palillo de madera estéril sobre papel filtro estéril y con una jeringa añadiendo a la muestra una gota de $\text{N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina}$, resultando citocromo C oxidasa positiva aquellos aislados que presentaron un cambio de coloración de blanco a azul y como negativos los que no presentaron cambios de coloración. La prueba catalasa se llevó a cabo colocando una muestra de cada aislado con un palillo de madera estéril sobre un portaobjeto, sobre la muestra se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 30%, aquellos aislados que presentaron burbujeo al añadir el peróxido de hidrógeno se consideran positivos a catalasa y los que no presentaron burbujas son negativos.

La tinción Gram, se hizo colocando una gota de agua estéril sobre un portaobjetos, y sobre la gota de agua y con un palillo de madera estéril se colocó muestra del aislado y se mezclaron. Se dejó evaporar el agua y una vez que la muestra se secó, se fijó con el mechero. Posteriormente, se realizó la tinción, primero se colocó una gota de cristal violeta cubriendo toda la muestra dejándolo durante 1 min y luego se enjuagó con agua, seguido se adicionó lugol a la muestra durante 1 min y se lavó con agua, se añadió una gota de mezcla alcohol- acetona por 30 s a la muestra y se lavó con agua,

finalmente se cubrió con una gota de safranina por 30 s y se lavó. Una vez realizadas todas las tinciones, se observaron al microscopio con aumento 100x y se determinó si los aislados resultaron ser bacterias Gram positivas o negativas. En base a las pruebas anteriores se corroboró la pureza de los aislados para continuar con las técnicas siguientes. Cabe mencionar que todo el material que se utilizó fue esterilizado en la autoclave marca Napco (8000-DSE).

5.3 Selección de Aislados con Actividad Fenoloxidasa

Para llevar a cabo la cuantificación de la actividad enzimática fenoloxidasa, previamente fue necesario realizar una selección de aislados mediante la prueba de tamizaje en placa. Ésta consistió en inocular los aislados en un caldo de inducción preparado a partir de dos soluciones que posteriormente se mezclaron hasta su homogenización. La primera consistió en buffer M162 constituido por 0.5 mL de citrato férrico 0.01 M, 0.04 g de sulfato de calcio deshidratado, 0.2 g de cloruro de magnesio hexahidratado, 0.1 g de ácido nitriloacético aforados con 100 mL de agua destilada. La segunda, fue una solución micronutritiva, que se preparó mezclando 0.5 mL de ácido sulfúrico, 0.228 g de sulfato de magnesio hidratado, 0.5 g de sulfato de zinc heptahidratado, 0.5 g de ácido bórico, 0.025 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.025 g de molibdato de sodio hidratado, 0.045 g de cloruro de cobalto aforados con 100 mL de agua destilada. Para preparar 1 L del caldo de inducción se disolvieron 2 g de Triptona más 2 g de extracto de levadura en 900 mL de agua destilada y 100 mL de la solución M162 ya conteniendo la solución micronutritiva, luego se ajustó el pH a 7.0 ± 0.2 y se esterilizó para su posterior uso (Kaur *et al.*, 2017).

Los aislados bacterianos se inocularon en el caldo de inducción y se incubaron en agitación por 72 h a 40 °C a una velocidad de 170 rpm (shaker Ika modelo KS 3000i). Transcurrido este tiempo, se escogieron aquellos aislados que presentaron crecimiento en el caldo mencionado, para sembrar las bacterias en agar Luria Bertani (LB) adicionado con sulfato de cobre (0.1%) ya que el cobre es cofactor de la enzima y L-tirosina (0.1%) que es el sustrato. Aquellos aislados que no crecieron en el caldo de inducción fueron descartados del estudio. Los aislados que mostraron crecimiento con colonias color café se consideraron positivos a fenoloxidasa, esto se debe a que la enzima actúa causando oxidación del sustrato con la posterior polimerización del mismo formando pigmentos

de color café (García *et al.*, 2006). Como control positivo se usó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, ya que es productora de la enzima fenoloxidasa y como control negativo se inoculó en agar LB sin adicionar sulfato de cobre ni tirosina, todo lo anterior se realizó por duplicado. Para la cuantificación de la proteína polifenoloxidasa se utilizó el Kit de Pierce BCA (Thermo Scientific), el resultado se expresó como U/ μ g de proteína.

5.4 Cuantificación de Actividad Fenoloxidasa

Los cultivos bacterianos obtenidos del cultivo de inducción se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min para sedimentar los restos celulares y obtener sobrenadantes transparentes. Se añadió 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), para inhibir la actividad proteasa en el sobrenadante. La enzima se obtuvo por precipitación del sobrenadante con sulfato de amonio a una saturación del 85%. Posteriormente se centrifugó a 13, 000 rpm durante 20 min. El sedimento de proteína se lavó con buffer de fosfato 0.1 M pH 6.0 y se dializó contra el mismo buffer de fosfato. La actividad fenoloxidasa se determinó espectrofotométricamente usando la metodología descrita por Dalfart y colaboradores (2006), registrando el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 475 nm, utilizando como sustrato L-tirosina. La mezcla de reacción consistió en adicionar 50 μ L de L-tirosina a una concentración de 0.1 M (disuelta en fosfato 2 mM pH 5) más 900 μ L de buffer de fosfato 100 mM (pH 5.5), la reacción se inició mediante la adición de 50 μ L de la muestra enzimática. Para reportar la actividad específica enzimática se cuantificó la proteína producida utilizando el kit de Pierce (Thermo Scientific). Una unidad enzimática específica es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto a 40 °C.

5.5 Identificación de Aislados con Actividad Fenoloxidasa

Los aislados que presentaron actividad fenoloxidasa cuantificable, fueron identificados utilizando el gen ribosomal RNA 16S. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico usando un mini

kit QIA amp ADN (QIAGEN, Alemania). Se utilizaron los iniciadores universales 519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') y 1301R (5'- TACTAGCGATTCCGACTTC-3') para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min cada uno, alineación del iniciador a 5 °C por 1 min y extensión de la cadena de ADN a 72 °C por 2 min y un paso final de extensión de cadena 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en gel de electroforesis con agarosa al 1% y visualizados con una tinción con Gel-Red (Biotium, USA). La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo con una columna GFX (Amersham Bio-Science, USA) y la concentración y pureza fue medida en un espectrofotómetro Nanodrop 2000, tomando en cuenta la relación: 260/280. La identidad se obtuvo por comparación con secuencias depositadas previamente en la base de datos del GenBank usando el algoritmo Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.6 Análisis Estadístico

Se le realizó una ANOVA de una vía de los datos de la cuantificación de la actividad fenoloxidasa, para determinar si existen diferencias significativas entre la actividad enzimática obtenida de los diferentes aislados positivos. La comparación de medias se realizó según Fisher ($p \leq 0.05$), con el programa NCSS, 2023 (NCSS, 2023).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio se utilizaron los aislados bacterianos que fueron obtenidos de intestinos de larvas de *Acrobasis nuxvorella* en trabajos previos del laboratorio. Las larvas de *Acrobasis nuxvorella* fueron colectadas en plantas de nogal pecanero de huertos ubicados en Camargo, Chihuahua. Los aislados bacterianos se mantuvieron preservados en caldo soya tripticaseína (TSB) y glicerol al 80% a temperatura de -80°C.

6.1 Reactivación de Aislados de *Acrobasis nuxvorella*

Los aislados que se encontraban almacenados a -80 °C fueron reactivados para realizar las pruebas bioquímicas. En el cuadro 1 se muestran los resultados de esta evaluación, donde se aprecia la división en grupos, cada grupo representa el número de aislados recuperados, el medio de cultivo que provienen se muestra en la columna 2, en la tercera columna se muestran los medios de cultivo de reactivación de los aislados, la cuarta columna muestra el número de aislados recuperado por grupo, las columnas posteriores muestran los resultados de las pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa y gram). Se obtuvieron 178 aislados bacterianos viables de 224 que se encontraban en almacenamiento.

6.2 Pruebas Bioquímicas de Aislados del Intestino de *A. nuxvorella*

Respecto a las pruebas bioquímicas, el 100 % de los aislados resultaron catalasa positivos, en la prueba de oxidasa únicamente 10 fueron positivas, el resto negativas y finalmente en la prueba de tinción Gram de las 178 sólo 2 resultaron Gram negativa, el resto resultaron Gram positivas. una vez realizadas las pruebas bioquímicas observamos las características morfológicas de las colonias de los aislados, en los bordes observamos que eran ondulados, enteros o filamentosos, las formas

eran circulares o rizoides, y las elevaciones que presentaron algunas eran convexas y otras planas siendo de textura mucoide o membranosa. Martínez y colaboradores (2021) realizaron un estudio de la diversidad bacteriana contenida en el intestino de 3 depredadores de la cochinilla de nopal, obteniendo aislados con características morfológicas similares a las reportadas en nuestro estudio, respecto a la tinción Gram ellos obtuvieron aproximadamente la mitad de los aislados como Gram negativo y la otra mitad Gram positivo, mientras que en nuestro estudio el 98.8 % resultaron Gram positivas.

Cuadro 1. Caracterización mediante pruebas bioquímicas de aislados de bacterias intestinales obtenidas de larvas de *A. nuxvorella*.

Grupo	Medio de cultivo de aislamiento	Medio de cultivo de reactivación	N. de aislados	Catalasa	Oxidasa	Gram
1	Caldo Luria Bertani	Caldo TSB	32	32 +	29 -	32 +
	Agar LB	Agar TSA		0 -	3 +	0 -
2	Caldo Pseudomonas	Caldo TSB	23	23 +	22 -	22 +
	Agar Pseudo. King's	Agar TSA		0 -	1 +	1 -
3	Caldo TSB	Caldo TSB	31	31 +	27 -	31 +
	Agar TSA	Agar TSA		0 -	4 +	0 -
4	Caldo PDB	Caldo TSB	40	40 +	37 -	39 +
	Agar PDA	Agar TSA		0 -	3 +	1 -
5	Caldo MRS	Caldo TSB	26	26 +	25 -	26 +
	Agar MRS	Agar TSA		0 -	1 +	0 -
6	Caldo Cerebro corazón	Caldo TSB	26	26 +	24 -	26 +
	Agar sangre	Agar TSA		0 -	2 +	0 -
Total, de aislados			= 178			

6.3 Ensayo de Tamizaje de Actividad Fenoloxidasa en Aislados Bacterianos

Con base en las pruebas bioquímicas y características morfológicas se seleccionaron 65 aislados por sus características diferenciadas. De los aislados seleccionados, 44 presentaron crecimiento en el caldo de inducción, el cual sirvió de preparación a las bacterias para la producción de la enzima. Los aislados inducidos fueron sembrados en agar Luria Bertani (LB) con sulfato de cobre y tirosina

para evaluar la actividad de fenoloxidasa. En el cuadro 2 se muestran los 9 aislados que presentaron crecimiento con coloración marrón, que es la indicación de producción de la enzima fenoloxidasa. Para esta evaluación se utilizó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo, la cual es conocida por producir la enzima y como control negativo el agar LB sin adicionar sulfato de cobre ni tirosina.

La figura 3 muestra placas Petri con crecimiento de bacterias productoras de fenoloxidasa, la cual produce un cambio de coloración (marrón) de la colonia. La Figura 3A, muestra el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, nuestro control positivo en agar LB, conteniendo sulfato de cobre y tirosina como sustrato de la enzima, en donde el cobre actúa como un cofactor, ya que la enzima fenoloxidasa es parte del grupo de enzimas oxidasas multicobre (Sánchez *et al.*, 2011). La Figura 3B muestra al aislado 66 que resultó positivo para producir la enzima fenoloxidasa en este ensayo. Cada imagen muestra el crecimiento bacteriano en el agar LB que fue nuestro control negativo.

Cuadro 2. Aislados bacterianos que presentaron un resultado positivo de producción de enzima fenoloxidasa en ensayo de tamizaje.

Grupo al que pertenecen	Aislados fenoloxidasa positiva
1	24, 65, 66
2	30
3	31, 62
4	28
6	23, 29

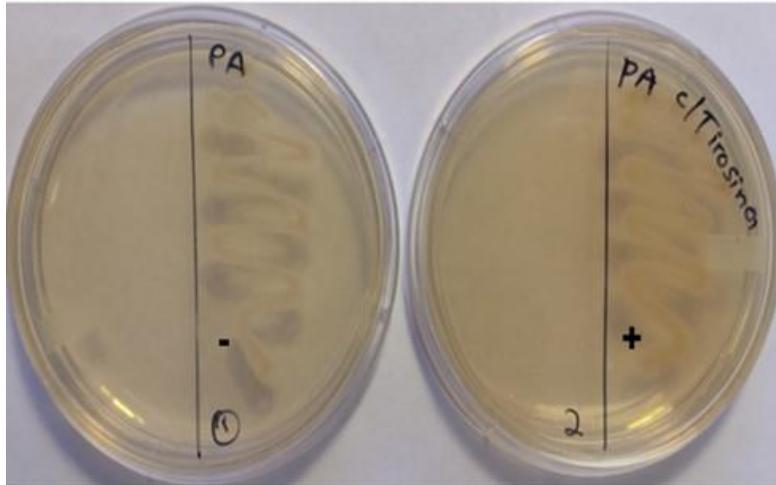


Figura 3. A) *Pseudomonas aeruginosa* (control positivo).



Figura 3. B) Aislado 66 fenoloxidasa positivo.

6.4 Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa

Se realizó la cuantificación de actividad fenoloxidasa en espectrofotómetro de los 9 aislados que mostraron actividad en el ensayo de tamizaje. El resultado se muestra en la figura 4. Se puede apreciar que todos los aislados presentaron actividad enzimática específica en un rango de 0.8 a 3.5 U/ μ g de proteína, donde la menor actividad la presentó el aislado 30 y la mayor el 31. El aislado 28 presentó una actividad enzimática estadísticamente igual ($p \leq 0.05$) a la presentada por el aislado 30. Los aislados 23, 66, y 24 no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0.05$) siendo las

actividades de: 3.2, 3.1 y 2.8 U/μg de proteína, respectivamente. Los aislados 62, 29 y 65 fueron estadísticamente iguales entre sí, presentando una actividad de: 2.7, 1.8 y 1.5 U/μg de proteína, respectivamente. El control positivo que es *Pseudomonas aeruginosa* fue el que presentó la actividad más baja siendo de: 0.7 U/μg de proteína.

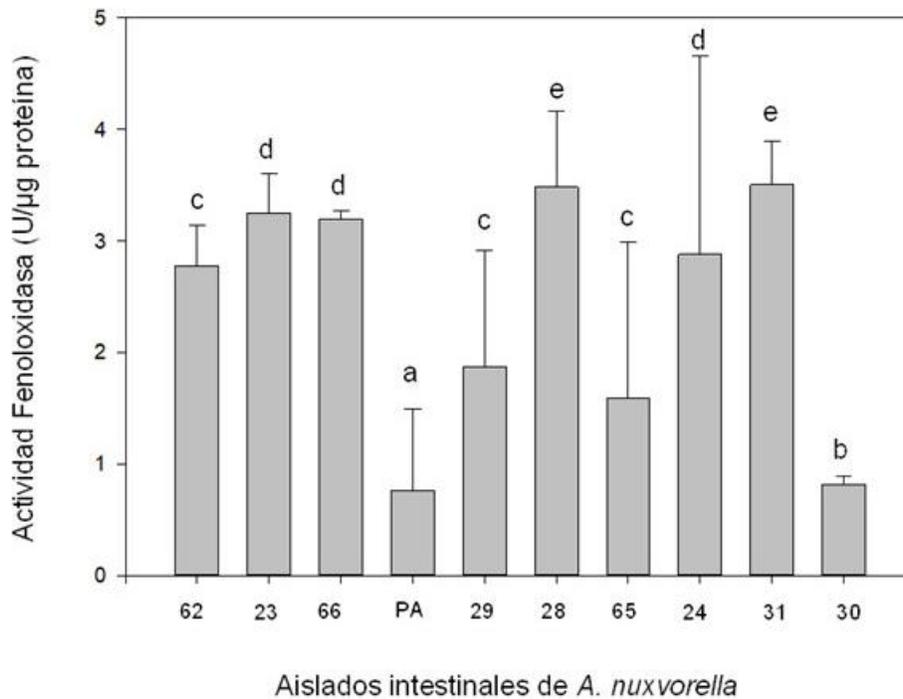


Figura 4. Actividad Fenoloxidasa producida por los aislados bacterianos intestinales obtenidos del intestino de larvas *A. nuxvorella*. PA=*Pseudomonas aeruginosa* como control positivo. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

6.5 Identificación de Aislados Positivos a Actividad Fenoloxidasa.

La identificación de los aislados que resultaron productores de fenoloxidasa mostrando actividad específica (Figura 4), se muestran en el cuadro 3. Utilizando el resultado de la secuenciación del gen ribosomal 16S y realizando comparaciones con las secuencias depositadas en GenBank utilizando el algoritmo BLAST, se llegó a la identificación de las especies. Los aislados del grupo 1 etiquetados como 24 y 66 corresponden a la bacteria *Bacillus pumilus*, al igual que el aislado 29

del grupo 6. El aislados 62 y 65 del grupo 1, así como el aislado 28 del grupo 4 y el 23 del grupo 6 son *Bacillus safensis*. En cuanto al aislado 31 del grupo 3 corresponde a la especie *Bacillus xiamenensis* y finalmente el aislado 30 del grupo 2 corresponde a *Bacillus altitudinis*.

El resultado de la identificación de las bacterias, concuerda con la revisión realizada por Paniagua-Voirol y colaboradores (2018) donde al revisar los principales géneros de bacterias que han sido reportados en el intestino de los Lepidópteros, los *Bacillus* ocupan el segundo sitio en abundancia después de *Pseudomonas*. La especie *Bacillus pumilus* fue previamente reportada como productora de enzimas multicobre oxidasa, exhibiendo actividad manganeso oxidasa (Su *et al.*, 2013).

Todas las especies productoras de la enzima fenoloxidasa identificadas en este trabajo pertenecen al género *Bacillus*. *Bacillus safensis* esta reportado como capaz de sobrevivir en ambientes extremos. Esta capacidad se debe a sus características fisiológicas y genotípicas; la bacteria se aisló por primera vez como contaminante de la instalación de ensamblaje de naves espaciales (SAF) en el Laboratorio de Propulsión a Chorro en Estados Unidos (Lateef *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Resultado de la identificación de los aislados productores de la enzima fenoloxidasa

GRUPO	AISLADO	IDENTIFICACION
1	24	<i>Bacillus pumilus</i>
1	65	<i>Bacillus safensis</i>
1	66	<i>Bacillus pumilus</i>
2	30	<i>Bacillus altitudinis</i>
3	31	<i>Bacillus xiamenensis</i>
3	62	<i>Bacillus safensis</i>
4	28	<i>Bacillus safensis</i>
6	23	<i>Bacillus safensis</i>
6	29	<i>Bacillus pumilus</i>

7. CONCLUSIÓN

Las larvas de *Acrobasis nuxvorella* contiene bacterias intestinales productoras de la enzima fenoloxidasa que podrían estar capacitando al insecto en el catabolismo de los compuestos fenólicos presentes en su dieta.

8. REFERENCIAS

- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H. y Kaltenpoth, M. 2016. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1567-1577.
- Blow, F., Bueno, E., Clark, N., Zhu, D. T., Chung, S. H., Güllert, S., Schmitz, R. y Douglas, A. E. 2020. B-vitamin nutrition in the pea aphid-Buchnera symbiosis. *Journal of Insect Physiology*, 126, 104092.
- Castillo, A. A. F., Harris, M., Puebla, A. A. F., y Zamorano, W. V. 2013. Trampeo e identificación de la feromona sexual del gusano barrenador de la nuez, *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae) en México. *Biotecnia*, 15(2), 25-30.
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., Book, A.J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W. Grubbs, K.J., Horn, H.A., Hoffmann, F.M., Klassen, J.L., Knack, J.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Muller, L., Melo, W.G.P., Pinto-Tomás, A.A., Schmitz, A., Wendt-Pienkowski, E., Wildman, S., Zhao, M., Zhang, F., Bugni, T.S., Andes, D.R., Pupo, M.T. y Currie, C. R. 2019. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*, 10(1), 516.
- Claus, H. 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35:93-96
- Corella-Madueño, A. G., Fú-Castillo, A., Harris, M., Martínez-Téllez, M. A., y Vargas-Arispuro, I. 2012. Life cycle of laboratory-reared *Acrobasis nuxvorella* Neunzig (Lepidoptera: Pyralidae): a pecan nut pest. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 7(4), 384-389.
- Corella-Madueño, M. A., Harris, M. K., Fu-Castillo, A. A., Martínez-Téllez, M. A., Valenzuela-Soto, E. M., Gálvez-Ruiz, J. C., y Vargas-Arispuro, I. 2011. Volatiles emitted by *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch as a prelude for semiochemical investigations to focus on *Acrobasis nuxvorella* Nuenzig (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Management Science*, 67(12), 1522-1527.
- Corrales-Maldonado, C. G., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Carrillo, J. L., Pérez-Morales, R., Martínez-Téllez, M. Á., Aispuro-Hernández, E., Arellano-Gil, M. y Castro-Espinoza, L. 2022. The gut bacteria symbionts from the monophagous insect *Acrobasis nuxvorella* produce tannase for the digestion of *Carya illinoensis* tannins. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(4), 102005.
- Crosa, C. F. R., Marco, R. D., Barreto, C. F., Souza, R. S. D., Yamamoto, R. R., y Martins, C. R. 2023. Budbreak of pecan cultivars subject to artificial chill. *Revista Ceres*, 70, 42-50.
- Dalfard, A. B., Khajeh, K., Soudi, M. R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., y Sajedi, R. H. 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1409-1416.
- Danso, B., Ali, S. S., Xie, R., y Sun, J. 2022. Valorization of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase-and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species. *Fuel*, 310, 122333.
- Dittmer, N. T. y Kanost, M.R. 2010. Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles. *Insect*

Biochemistry and Molecular Biology. 40:179e188.

- Dittmer, N. T. y Kanost, M. R. 2010. Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 179e188.
- Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J. & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades*, 2-28. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> Fecha de acceso: 26 de abril de 2017.
- Fu-Castillo, A. A., Harris, M. K., y Vargas-Arispuro, I. 2010. Activation of hibernating *Acrobasis nuxvorella* Neunzig larvae as an effect of *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch budbreak. *Southwestern Entomologist*, 35(4), 551-556.
- Fu Castillo, A. A., Harris, M., Fontes Puebla, A. A., y Verdugo Zamorano, W. 2013. Trampeo e identificación de la feromona sexual del gusano barrenador de la nuez, *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae) en México. *Biotecnia*, 15(2), 25-30.
- García, C. L., Giraldo, G. A., Hurtado, H., y Mendivil, C. O. 2006. Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano gros michel en diferentes estados de maduración. *Vitae*, 13(2), 13-19.
- Harris M.K., Fu AA, Núñez, H, Aranda-Herrera E, Moreira, J.A., McElfresh, J.S., Millar, J.G. 2008. A new pheromone race of *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol.* Jun;101(3):769-76. doi: 10.1603/0022-0493(2008)101[769: anproa]2.0.co;2.
- Jing, T. Z., Qi, F. H., y Wang, Z. Y. 2020. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? *Microbiome*, 8(1), 1-20.
- Ju, J. F., Bing, X. L., Zhao, D. S., Guo, Y., Xi, Z., Hoffmann, A. A., Zhang, K.J., Huang, H.J., Gong, J.T., Zhang, X. y Hong, X. Y. 2020. *Wolbachia* supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *The ISME Journal*, 14(3), 676-687.
- Kaur, K., Singh, G., Gupta, V., Capalash, N., y Sharma, P. 2017. Impact of phosphate and other medium components on physiological regulation of bacterial laccase production. *Biotechnology Progress*, 33(2), 541-548.
- Knutson, A. E., y Ree, B. 2019. Biology and management of the pecan nut Casebearer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1), 29.
- Kumar, P., Dubey, K. K., Usmani, Z., Sharma, M., y Gupta, V. K. 2022. Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16(1), 244-264.
- Lateef, A., Adelere, I. A., y Gueguim-Kana, E. B. 2015. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biología*, 70(4), 411-419.
- Martínez-Martínez, S., Rodríguez-Leyva, E., Aranda-Ocampo, S., Santillán-Galicia, M. T., Hernández-López, A., y Guzmán-Franco, A. W. 2021. Bacteria associated with the intestinal tract of three predators of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae).
- MsangoSoko, K., Bhattacharya, R., Ramakrishnan, B., Sharma, K., y Subramanian, S. 2021. Cellulolytic activity of gut bacteria isolated from the eri silkworm larvae, *Samia ricini*, (Lepidoptera: Saturniidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41, 2785-2794.

- NCSS 2023 Statistical Software. 2023. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss.
- Ottaviani, E., Ventura, N., Mandrioli, M., Candela, M., Franchini, A. y Franceschi, C. 2011. Gut microbiota as a candidate for lifespan extension: an ecological/evolutionary perspective targeted on living organisms as metaorganisms. *Biogerontology*. 12:599-609.
- Paniagua-Voirol L.R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M. y Fatouros, N. 2018. Bacterial symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9. Artículo 556.
- Rasiravuthanahalli, K. G., Revathi, S., Rameshkumar, N., Krishnan, M., y Kayalvizhi, N. 2017. Digestion of Tannin by Bacteria *Enterobacter cloacae* from the Gut of Indian Mole Cricket (*Gryllotalpa krishnani*). *Journal of Bioprocess and Biotechniques*, 7(302), 2.
- Sánchez-Rosario, Yasmin, Sánchez, José E., Vázquez-Duhalt, Rafael, y Andrade-Gallegos, René H. 2011. Producción y caracterización de la fenoloxidasa de *Scytalidium thermophilum*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 31-42
- Scharf, M. E., y Peterson, B. F. 2021. A century of synergy in termite symbiosis research: linking the past with new genomic insights. *Annual Review of Entomology*, 66, 23-43.
- Sharma, K. P. 2019. Tannin degradation by phytopathogen's tannase: A Plant's defense perspective. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101342.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N. y Sharma, P. 2011. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 10:309-326.
- Su, J., Bao, P., Bai, T., Deng, L., Wu, H., Liu, F., y He, J. 2013. CotA, a multicopper oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, exhibits manganese-oxidase activity. *PLoS One*, 8(4), e60573.
- Valles, M., Kamaruddin, A. F., Wong, L. S., y Blanford, C. F. 2020. Inhibition in multicopper oxidases: a critical review. *Catalysis Science & Technology*, 10(16), 5386-5410.
- Vargas-Arispuro, I., Corella-Madueño, M. A. G., Harris, M. K., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., Fu-Castillo, A., y Orozco-Avitia, A. 2013. Semiochemicals released by pecan alleviate physiological suppression in overwintering larvae of *Acrobasis nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental entomology*, 42(5), 942-948.
- Van Moll, L., De Smet, J., Cos, P., y Van Campenhout, L. 2021. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5), 562-579.
- Wu, K., Zhang, J., Zhang, Q., Zhu, S., Shao, Q., Clark, K. D., Liu, Y. y Ling, E. 2015. Plant phenolics are detoxified by prophenoloxidase in the insect gut. *Scientific Reports*, 5(1), 16823.
- Yuan, Y., Li, L., Zhao, J., y Chen, M. 2020. Effect of tannic acid on nutrition and activities of detoxification enzymes and acetylcholinesterase of the fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of insect science*, 20(1), 8.
- Zhang, X., Feng, H., He, J., Liang, X., Zhang, N., Shao, Y., Zhang, F. y Lu, X. 2022. The gut commensal bacterium *Enterococcus faecalis* LX10 contributes to defending against *Nosema bombycis* infection in *Bombyx mori*. *Pest Management Science*, 78(6), 2215-2227.
- Zhao, M., Lin, X., y Guo, X. 2022. The role of insect symbiotic bacteria in metabolizing phytochemicals and agrochemicals. *Insects*, 13(7), 583.