

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MICROBIOTA DEL INSECTO COMESTIBLE *ACHETA DOMESTICUS*

Effect of temperature on the microbiota of the edible insect *Acheta domestica*

Beltrán-Soro, L.¹; Bravo-Pena, Y.¹; Galián, J.^{1,2}

1. Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Mare Nostrum, E-30100, Murcia, España

2. ArthropoTech S.L. Edificio Vitalis, 2ª Planta, Despacho 2.15, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España

Autor para correspondencia: Beltrán-Soro, L., leonardo.beltrans@um.es

Tipo artículo: Trabajo Fin de grado (Ciencia y Tecnología de los Alimentos)

Enviado: 11/11/2022

Aceptado: 27/03/2023

RESUMEN

La microbiota de los insectos desempeña funciones esenciales en el metabolismo de los mismos, contribuyendo al correcto funcionamiento del sistema inmune y favoreciendo la digestión. La especie de grillo *Acheta domestica* ha sido recientemente autorizada para consumo humano. La producción masiva de esta especie implica grandes costes energéticos en la zona de cría, por lo que variaciones en la temperatura de la sala pueden suponer un importante ahorro en el coste de producción. Este estudio tiene como objetivo analizar la influencia de la temperatura en la composición de la microbiota intestinal, planteándose la hipótesis de que los cambios de temperatura afectan a la microbiota de insectos ectotermos. Para ello se seleccionaron dos grupos de grillos en cajas separadas y se les sometió a temperaturas de 20 °C y 30 °C respectivamente. Posteriormente se les extrajo el intestino y se cuantificaron sus poblaciones bacterianas mediante técnicas metagenómicas. Los resultados obtenidos mostraron que los taxones más abundantes apenas variaron en todas las muestras. La abundancia relativa de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes fue de $31,5 \pm 2,06$ %, en Bacteroidetes $24,25 \pm 3,89$ % y en Proteobacteria $44 \pm 4,85$ %. La única muestra que mostró diferencia fue la criada a 30°C, en la que se detectó un 0,8% de Actinobacteria. Al cuantificar estas poblaciones se observó que la mayor parte de la microbiota en todas las muestras es similar

a nivel taxonómico de filo y nivel de clase, excepto a la temperatura de 30 °C en la que se detecta un pequeño porcentaje de Actinobacterias. En conclusión, se podría decir que la temperatura de cría de las granjas de grillos ha influido ligeramente en la composición de la microbiota intestinal, por lo que se acepta la hipótesis inicial.

Se ha observado una alta mortalidad en la muestra mantenida a 30°C, lo que sugiere que este factor debe ser cuidadosamente considerado en la cría masiva de grillos.

Palabras clave: diversidad bacteriana, comunidades bacterianas, bacterias intestinales, mutualismo, sistema inmune

ABSTRACT

The insect microbiota performs essential functions in their metabolism, contributing to the proper functioning of the immune system and favoring digestion. The cricket species *Acheta domesticus* has recently been authorized for human consumption. The massive production of this species implies large energy costs in the breeding area, so variations in room temperature could mean significant savings in production costs. This study aims to analyze the influence of temperature on the composition of the intestinal microbiota, considering the hypothesis that changes in temperature affect the microbiota of ectothermic insects. For this, two groups of crickets were selected in separate boxes and subjected to temperatures of 20 °C and 30 °C, respectively. Subsequently, their intestines were removed and their bacterial populations were quantified using metagenomic techniques. The results obtained showed that the most abundant taxa hardly varied in all samples. Abundance relatives of Bacteria belonging to the phylum Firmicutes was $31.5 \pm 2.06\%$, in Bacteroidetes $24.25 \pm 3.89\%$ and in Proteobacteria $44 \pm 4.85\%$. The only sample showing difference was that reared at 30°C, in which 0.8% of Actinobacteria was detected. In conclusion, it could be said that the rearing temperature of cricket farms has slightly influenced the composition of the intestinal microbiota, therefore the initial hypothesis is accepted. Incidentally, high mortality has been observed in the sample kept at 30°C, suggesting that this factor should be carefully considered in massive rearing of crickets.

Keywords: bacterial diversity, bacterial communities, intestinal bacteria, mutualism, immune system

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Consumo de insectos

El consumo de insectos es una práctica extendida desde hace cientos de años en determinadas zonas del mundo como América del sur, Asia o África, (Jongema 2017). Sin embargo, en las últimas décadas está empezando a surgir un cierto interés por el consumo de insectos en Europa y otras partes del mundo en las que tradicionalmente no se consumían. Comparado con la producción ganadera tradicional la producción de insectos tiene una mejor tasa de conversión de biomasa, calidad nutricional similar o mejor y consume una menor cantidad de agua, comida y espacio. Estos factores los convierten en potenciales sustitutos de ingredientes de piensos para ganado o piscifactorías como las harinas de sangre, pescado, guisante o soja. Además de su uso

en ganadería, recientemente se aprobó el uso de *Acheta domesticus* procesado para consumo humano (Reglamento de Ejecución (UE) 2022/188 de la Comisión, Unión Europea, 10 de febrero de 2022). Debido a estos factores se espera que para 2030 el valor de mercado de la industria global de insectos comestibles sea de 7,96 billones de dólares de acuerdo con la tasa de crecimiento anual prevista del 24.4% en el periodo de 2019 a 2030 (Meticulous Market Research Pvt.Ltd., 2019). De cara a este crecimiento es necesario realizar más estudios sobre su seguridad alimentaria y potenciales peligros microbiológicos y de otros tipos de cara a su consumo AECOSAN (2018).

1.2. Importancia de la microbiota en insectos

El intestino de los insectos presenta entornos distintivos para la colonización microbiana, y las bacterias en el intestino potencialmente

dan muchos beneficios a sus hospedadores. Los insectos tienen un alto grado de dependencia de las bacterias intestinales para funciones básicas. La mayoría de los intestinos de los insectos contienen pocas especies microbianas en comparación con los intestinos de los mamíferos, pero algunos insectos albergan grandes comunidades intestinales de bacterias especializadas. Otros son colonizados solo de manera oportunista y escasa por bacterias comunes del medio ambiente. Los tractos digestivos de los insectos varían largamente en morfología y propiedades fisicoquímicas, factores que influyen en gran medida en la estructura de la comunidad microbiana. Uno de los obstáculos para la evolución de asociaciones íntimas con los microorganismos intestinales es la falta de rutas de transmisión fiables entre los hospedadores. Aquí, los insectos sociales, como las termitas, hormigas y abejas, son excepciones: las interacciones sociales brindan oportunidades para la transferencia de bacterias intestinales (trofalaxia), y se han encontrado algunas de las comunidades intestinales más distintivas y consistentes, con funciones beneficiosas especializadas en nutrición y protección en especies de insectos sociales. Aun así, también se ha demostrado que las bacterias intestinales de otros insectos contribuyen a la nutrición, la protección contra parásitos y patógenos, la modulación de las respuestas inmunitarias y la comunicación. El alcance de estos roles aún no está claro y espera más estudios (Engel y Moran, 2013).

De acuerdo con Tinker y Ottesen (2016), la microbiota intestinal juega un papel trascendental en la salud general de su hospedador. Una microbiota intestinal saludable generalmente ayuda con la defensa contra patógenos y la digestión y absorción de nutrientes de los alimentos, mientras que la disbiosis o descompensación del equilibrio microbiano de la microbiota intestinal se ha asociado con una salud reducida.

Jung *et al.* (2014) llevaron a cabo un análisis de la microbiota del intestino de las larvas de *Tenebrio molitor*. Había predominio de espe-

cies del género *Spiroplasma*, pero se encontró variación en la composición de la comunidad entre los individuos de *T. molitor*. La estructura de la comunidad de bacterias intestinales no se vio afectada significativamente por la presencia de antibióticos o por la exposición de las larvas de *T. molitor* a una comunidad de bacterias del suelo muy diversa.

Tinker y Ottesen (2016) vieron que la cucaracha *Periplaneta americana* alberga una microbiota diversa en el intestino grueso que abarca cientos de especies microbianas. Los resultados mostraron que la microbiota del intestino posterior de *P. americana* tiene una comunidad microbiana central altamente estable con una baja variación en las composiciones entre los individuos y un cambio mínimo en la comunidad en respuesta a los cambios en la dieta. Esta microbiota del intestino posterior está presente en individuos alojados en laboratorio y capturados en el medio silvestre, aunque los especímenes capturados en el medio silvestre exhibieron una mayor diversidad de bacterias de baja abundancia que se perdieron después de un cultivo prolongado en condiciones de laboratorio. Esta estabilidad taxonómica contrasta fuertemente con las observaciones de la microbiota intestinal de los mamíferos, que han demostrado ser muy sensibles a los cambios en la dieta. Una comparación de muestras de intestino grueso de *P. americana* con muestras fecales humanas indicó que la comunidad del intestino grueso de las cucarachas exhibía una mayor diversidad alfa pero una diversidad beta sustancialmente menor que el microbioma intestinal humano. Esto sugiere que las cucarachas han desarrollado mecanismos únicos para establecer y mantener una microbiota diversa y estable.

1.3. Estudio de microbiota de grillos

Uno de los primeros estudios sobre microbiota de grillos fue el de Santo Domingo *et al.* (1998) donde exploraron el efecto de 4 dietas

que varían el contenido de carbohidratos y proteínas sobre la estructura y función de la microbiota intestinal de los grillos. Se evaluaron las densidades bacterianas en el ADN extraído de la comunidad microbiana del intestino posterior. Las densidades bacterianas medidas por recuentos directos no fueron significativamente diferentes entre las cuatro dietas.

Posteriormente Ng *et al.* (2018) analizaron en qué medida la dieta y el medio ambiente influyen en la comunidad intestinal (presencia o ausencia de taxones) y la estructura (abundancia de taxones individuales). Este es un tema de creciente interés en la investigación de microbiomas. En este trabajo examinan las comunidades bacterianas intestinales de tres grupos de grillos: (1) grillos de campo capturados en la naturaleza, (2) grillos criados en laboratorio alimentados con comida para gatos y (3) grillos criados en laboratorio alimentados con dietas definidas químicamente. Estos autores mostraron que tanto el medio ambiente como la dieta alteraron en gran medida la estructura de la comunidad bacteriana intestinal. Así, los grillos silvestres tenían una mayor diversidad microbiana intestinal y mayores proporciones de Firmicutes a Bacteroidetes, en contraste con los grillos criados en laboratorio. Aunque los animales silvestres y de laboratorio diferían enormemente en sus comunidades bacterianas, el estudio demostró que la comunidad microbiana permanece estable desde los niveles taxonómicos de Phylum hasta Familia, independientemente de las diferencias en el medio ambiente y la dieta, lo que sugiere que los factores endógenos, como la genética del hospedador, tienen un mayor control en la conformación de la microbiota intestinal.

Ferguson *et al.* (2018) expusieron poblaciones de laboratorio de *Gryllus veletis* a condiciones de hibernación simuladas tanto en un microcosmos de laboratorio como en un microcosmos de campo que contiene suelo y hojas. En verano, otoño, invierno y primavera se separó el intestino de los grillos, para ver si

hay variación en la composición de la microbiota. Se vio que la composición del microbioma intestinal fue similar entre los microcosmos y, en general, fue altamente anaeróbica. En ambos microcosmos, se vieron variaciones estacionales similares en la composición del microbioma, donde la hibernación resultó en cambios permanentes en estas comunidades microbianas. En particular, la abundancia de *Pseudomonas* spp. disminuyó, y la de *Wolbachia* spp. aumentó durante el invierno. En general demostraron que el microbioma intestinal cambia estacionalmente.

Cassi *et al.* (2020) estudiaron las comunidades bacterianas de los grillos combinando métodos de cultivo microbiológico con secuenciación de alto rendimiento. Se investigó distintas comunidades microbianas (bacterias, mohos y levaduras) en grillos comestibles criados en laboratorio (*Acheta domesticus*) en un ambiente controlado. También se estudiaron los efectos de diferentes piensos sobre las cargas microbianas y las poblaciones de grillos. Los grillos se dividieron en tres lotes y se alimentaron con diferentes dietas (alimento de control, heno de trébol rojo cortado temprano (ECH), trébol rojo fresco cortado tarde (LCF) durante 62 días. El número de bacterias (TAC y Enterobacteriaceae) en grillos enteros crudos osciló entre 7 y 8 log ufc / g. Todos los lotes resultaron negativos para las bacterias transmitidas por alimentos *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Las comunidades bacterianas predominantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, con Firmicutes y Proteobacteria dominando en grillos alimentados con alimento control, Firmicutes dominando en grillos alimentados con LCF y Proteobacteria dominando en grillos alimentados con ECH.

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar la microbiota de *Acheta domesticus* (recientemente aceptado para consumo humano) durante su cría en distintas condiciones de temperatura a nivel de laboratorio. El conocimiento de las

comunidades microbianas presentes en estos insectos criados con diferentes temperaturas permitirá identificar cambios en la microbiota, riesgos potenciales de seguridad microbiológica y cómo pueden afectar a las condiciones de cría (Wynants, 2019).

La hipótesis que se plantea es que la microbiota va a cambiar con la temperatura del lugar de cría y mantenimiento del insecto, ya que al ser ectotermos los cambios en la temperatura ambiental repercuten en la temperatura del animal. Se espera que bacterias más sensibles a la temperatura puedan desaparecer del digestivo del animal y otras psicrófilas pueden proliferar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental y tratamientos a distintas temperaturas

Los grillos usados, adaptados a vivir en condiciones de laboratorio, procedían de la colonia del Departamento de Zoología y Antropología Física (Área de Biología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia y de la spin-off Arthropotech S.L. Se utilizaron especímenes adultos que no volviesen a mudar, ya que al mudar se desprenden de la parte final e inicial del intestino, lo que provocaría cambios en la microbiota. También se evita que otros grillos devoren las mudas viejas y se altere su dieta. Su alimentación constaba de copos de avena, zanahoria y agua.

Se separó a los grillos en 2 réplicas biológicas, una a 30°C y otra a 20°C. La de 20°C se dividió a su vez en 3 subréplicas (R1, R2 y R3) para obtener una muestra representativa. Se usaron 8 grillos por caja, de los cuales 5 se usarían para el análisis de la microbiota ($n=5$). Estos grillos tenían un peso promedio de 0.3126 ± 0.012 g. Para la réplica a 30°C se prepararon también 3 subreplicas (R1, R2 y R3). En la réplica a 30°C se daban muchos casos de canibalismo aun teniendo agua y comida, por lo que se separaron en cajas indi-

viduales. Esta conducta se podría deber a la mayor temperatura. En animales ectotermos los aumentos de temperatura aumentan la actividad y metabolismo, lo que puede acrecentar este tipo de conductas. Estos grillos tenían un peso promedio de 0.3126 ± 0.012 g.

Los grillos se alojaron en unas cajas de plástico con una tapa de rejilla, las cajas colectivas tenían unas medidas de 22x14x16 cm (LAA) y las individuales de 14x8x16 cm (LAA). En cada caja se colocaron unas hueveras de cartón para proporcionar refugio y minimizar los niveles de estrés. Como sustrato se usaron copos de avena que además servían como fuente de alimento. El agua la obtenían de zanahoria y bebederos hechos con tubos eppendorf con algodón en la tapa. La zanahoria y agua se renovaba cada 2-3 días y los copos de avena según se necesitase.

Las réplicas se recolectaron tras 28 días a las distintas temperaturas en estado adulto. Se le dio 28 días de tratamiento ya que la expectativa de vida de un grillo adulto es de aproximadamente un mes. Dándole este tiempo las posibilidades de observar un cambio en la microbiota serían mayores. Tras el tiempo a distintas temperaturas, los grillos se colocaron en cajas más pequeñas y se sacrificaron por congelamiento a -18°C. Posteriormente se descongelaron para la extracción del intestino durante 15 minutos aproximadamente.

2.2. Extracción y pretratamiento del intestino

Antes de realizar la extracción del intestino se lavaron los grillos en una disolución 1/10 de lejía al 20% y posteriormente se eliminó la lejía con agua destilada. La extracción se realizó en una cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad. La disección se llevó a cabo en seco mediante un corte a lo largo del abdomen, previamente habiendo separado la cabeza (Figura 1). Una vez obtenido el intestino se deposita en un eppendorf y se procede a la extracción del ADN.



Figura 1. Ejemplar hembra (izquierda) y macho (derecha) de *Acheta domesticus* en el que se señala el intestino sometido al análisis metagenómico.

Para la extracción del ADN se usó el kit Qiagen en columnas. El protocolo que se usó fue el siguiente:

Se prepararon 40 ml de buffer: 0,8 ml tampón Tris-Cl 1M, 0,16 ml EDTA 0,5 M y 0,48 ml de Triton X-100. Antes de la extracción se tomó un volumen (dependiendo del número de extracciones) de buffer y se le añadió la lisozima a 20 mg/ml. A continuación, se añadieron 180 μ l de la mezcla en un tubo con el tejido y se incubó a 37 °C durante 30-45 minutos. Para la extracción se añadieron 200 μ l de buffer AL + 25 μ l de proteinasa K + vórtex y se incubó a 56 °C hasta degradación (~24h). Tras la incubación se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm, se añadieron 200 μ l de etanol y se agitó en el vórtex.

Al finalizar la agitación se tomó todo el volumen y se pasó a una columna colocada en un tubo de colección y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Tras la centrifugación se descartó el contenido del tubo de colección. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección y se añadieron 500 μ l de buffer AW1. Entonces se centrifugó la mezcla resultante a 8000 rpm durante 1 minuto y se descartó de nuevo el contenido del tubo de colección. Entonces se coloca la columna en un nuevo tubo y se añaden 500 μ l de buffer AW2. Se centrifuga la mezcla a 14000 rpm durante 3 minutos y se descarta el contenido del tubo de colección. Se repitió la centrifugación hasta que la columna quedó seca.

Tras ver que la columna estaba seca, se colocó en un tubo eppendorf y añadieron 100 μ l de buffer AE en la membrana. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto para eluir.

Finalmente, se comprobó la cantidad de ADN con un espectrofotómetro NanoDrop-1000.

2.3. Análisis de comunidades bacterianas usando la amplificación de genes 16S RNA

Para el análisis se realizaron pools de 5 individuos para cada replica y se normalizó la cantidad de ADN usando una técnica de fluorescencia.

Se utilizó “Ion 16S Metagenomics Kit” (Ion Torrent) que incluye los cebadores para amplificar las regiones variables 2, 4 y 8 en un sólo tubo con amplicones resultantes de ~ 250 pares de bases (pb), ~ 288 pb y ~ 295 pb, respectivamente. Y en un segundo tubo, una reacción de PCR multiplex se dirige a las regiones variables 3, 6-7 y 9 con fragmentos resultantes de ~ 215 pb, ~ 260 pb y ~ 209 pb, respectivamente. Los cebadores han sido diseñados para capturar > 80% de las secuencias encontradas en la base de datos Greengenes con una identidad del 100%.

El análisis de datos primarios se realizó con Torrent Suite™ Software v5.12.1 (generando archivos. ubam que se facilitan al investigador) y el análisis avanzado utilizando el software Ion Reporter™ v5.18.0.0.

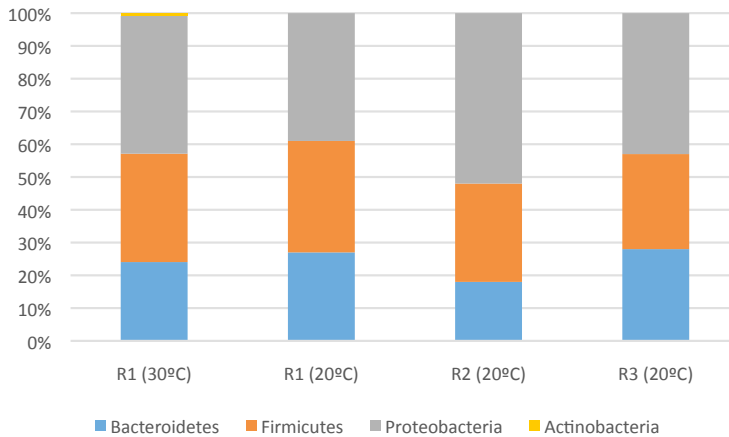
Para el análisis se utilizó un workflow específico para la determinación de diversidad en muestras de ARN 16s. A recomendación del personal del servicio de Metagenómica del IMIB se usaron los primers que habían por defecto y se dejó el filtro de las lecturas por abundancia en 10 lecturas, ya que al reducir más las lecturas saldrían demasiadas, lo que entorpecería la interpretación de los datos.

3. RESULTADOS

Para el análisis se profundizó a nivel taxonómico de clase, ya que al profundizar en taxones más específicos se obtenían datos menos precisos.

Tabla 1. Abundancia relativa en % de las poblaciones bacterianas a nivel filo.

Filo	R1 (30°C)	R1 (20°C)	R2 (20°C)	R3 (20°C)
Bacteroidetes	24	27	18	28
Firmicutes	33	34	30	29
Proteobacteria	42	39	52	43
Actinobacteria	0,8	0	0	0

**Figura 2.** Abundancia relativa en % de los filos hallados en todas las muestras de grillos (*Acheta domesticus*).

En las muestras R1 (20°C), R2 (20°C) y R3 (20°C) a nivel filo se encontró una abundancia relativa de poblaciones bacterianas similares. A nivel clase el resultado también fue de poblaciones similares excepto en la muestra R3 (20°C) en la que se detectaron Flavobacterias (Tabla 1) (Figura 2). Las bacterias del género *Flavobacterium* se encuentran en agua dulce, por lo que se puede haber producido una contaminación debido a un tratamiento inadecuado del suministro de agua. También se podría explicar este resultado por una contaminación microbiana durante la manipulación.

En total se obtuvieron una media de 81369 \pm 12453 lecturas por muestra, 100139 lecturas en la más abundante y 71839 en la menos abundante. Las comunidades bacterianas predo-

minantes en todas las muestras fueron las pertenecientes al filo Firmicutes (31.5 \pm 2.06 %), Bacteroidetes (24.25 \pm 3.89 %) y Proteobacteria (44 \pm 4.85 %). La muestra mantenida a 30°C fue la única que presentó bacterias pertenecientes al filo Actinobacteria (0.8 %). Debido a la alta mortalidad en la muestra a 30°C solo se analizó un pool de muestras (n=5). Se desconoce la causa de esta mortalidad, pero se podría atribuir a una mayor actividad por el aumento de la temperatura o muerte por causas naturales. Se descarta que sea por el *Acheta domesticus* Densovirus (AdDNV), ya que los grillos usados provienen de generaciones resistentes al mismo.

A nivel clase, Gammaproteobacteria fue la más abundante en todas las muestras, siendo un 44 \pm 4.85 % del total de la microbiota. El resto de

Tabla 2. Abundancia relativa en % de las poblaciones bacterianas a nivel clase.

Clase	R1 (30°C)	R1 (20°C)	R2 (20°C)	R3 (20°C)
Gammaproteobacteria	42	38	52	42
Clostridia	13	14	13	9
Bacilli	15	17	11	17
Erysipelotrichia	4	3	4	1
Bacteroidia	24	27	18	22
Flavobacteria	0	0	0	6

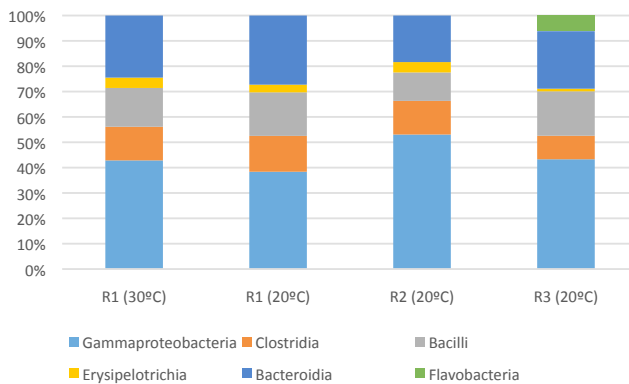


Figura 3. Abundancia relativa en % de las clases halladas en todas las muestras de grillos (*Acheta domesticus*).

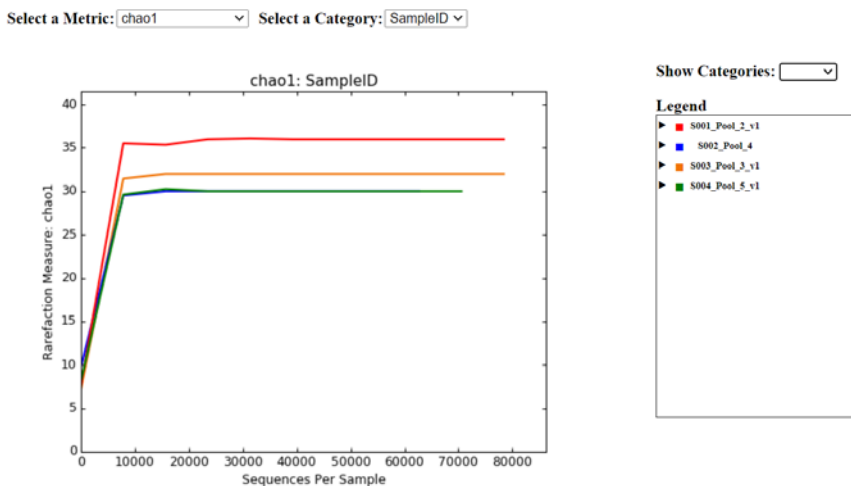


Figura 4. Representación gráfica de la Alpha-diversidad. La riqueza de familias deja de aumentar alrededor de las 10000 secuencias.

taxones bacterianos se encontraron en proporciones similares también, pero en menor cantidad. Esta microbiota estaba formada por Clostridia, Bacilli y Erysipelotrichia del filo Firmicutes, y Bacteroidia y Flavobacteria (solo en pool 5) del filo Bacteroidetes (Tabla 2) (Figura 3).

Usando las curvas de alpha-diversidad (Figura 4) se confirma que la profundidad de lecturas es aceptable ya que la inclusión de más secuencias no aumenta la riqueza de familias.

4. DISCUSIÓN

Los resultados indican que la temperatura tiene un efecto en la composición de la microbiota intestinal de los grillos. Los taxones bacterianos encontrados son similares a los encontrados por Fernandez-Cassi *et al.* (2020), una microbiota predominante de bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y un porcentaje muy pequeño de otros filos. La temperatura no parece alterar en gran medida los porcentajes de los filos mayoritarios. En las tres replicas a 20°C no se observa la aparición o desaparición de ninguno de los grupos de bacterias, solo se ha observado una variación en el porcentaje de los grupos mayoritarios. En el estudio realizado por Fernandez-Cassi *et al.* (2020) también se observan variaciones en los porcentajes de estos grupos mayoritarios en sus muestras control, lo que se podría deber a las diferencias entre individuos Ng *et al.* (2018) o también al hecho de que bacterias con un diferente número de operones ribosómicos se vean más representadas.

La única alteración significativa a nivel filo aparece en la muestra a 30°C, que es la única que tiene bacterias del filo Actinobacteria y estas solo representan un 0,8 % de la abundancia relativa.

De acuerdo con Ranjani *et al.* (2016), el filo de las Actinobacteria juega un rol fundamental en el ecosistema descomponiendo mezclas complejas de restos de plantas, animales y hongos. Son capaces de transformar compues-

tos orgánicos como hidrocarburos, pesticidas y compuestos aromáticos. Esta capacidad de bioconversión podría dar lugar a resistencia a determinados pesticidas usados para el control de plagas en plantaciones hortofrutícolas. Dentro de este filo se encuentran bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, un amplio grupo de bacterias conocidas por su uso como probióticos según describen Binda *et al.* (2018).

La ausencia de Actinobacterias en las muestras a 20°C se podría deber a su naturaleza mesófila y termófila. Su temperatura ideal para crecimiento va desde los 20°C a los 60°C Guevara Larrea (2017). Al estar al límite de la temperatura mínima de crecimiento se pueden ver desplazadas por otras bacterias que sí crecen bien a esta temperatura y por tanto acaban desapareciendo.

Una explicación alternativa a esta ausencia se refiere a razones mecánicas del procedimiento de extracción del digestivo, que habría provocado que en esa muestra no se extrajera totalmente el intestino, quedando algún resto que podría albergar de forma específica ciertos taxones menos representados.

En el caso de las Proteobacterias, constituyen la población mayoritaria en todas las muestras. En humanos representan aproximadamente un 5% de la abundancia relativa Shin *et al.* (2015). Se ha descubierto que en humanos el aumento de Proteobacterias en la microbiota está relacionado con el IBD Rizzatti *et al.* (2016) (término genérico utilizado para referirse a afecciones que incluyen la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias que afectan al intestino). Esas proteobacterias incluyen bacterias potencialmente patógenas como *Escherichia coli*, *Campylobacter concisus* y *Helicobacter enterohepatico* Mukhopadhyay *et al.* (2012).

En humanos Bacteroidetes y Firmicutes tienen funciones relacionadas con el metabolismo de nutrientes (Ismail *et al.* 2011). Son responsables de la fermentación de carbohidratos, síntesis de ácidos grasos de cadena corta como el

butirato, propionato o acetato (Kim y Milner 2007). Estos ácidos grasos tienen diversas funciones como ayuda en el mantenimiento del sistema inmune o proporcionar energía. El grupo de bacteroidetes también está involucrado en la transformación de tóxicos y compuestos mutagénicos (Smith *et al.* 2006). Cambios en estas poblaciones son capaces de producir distintas enfermedades como la obesidad (Méndez-Salazar *et al.* 2018).

De acuerdo a Engel y Moran (2013), la microbiota en insectos desempeña importantes funciones relacionadas con el sistema inmune y la digestión de alimentos (Bermingham *et al.* 2017). Muchas de estas funciones (especialmente Firmicutes y Bacteroidetes) pueden ser extrapolables de humanos a insectos, ya que se comparten algunas de las bacterias.

Estudiar como estos cambios en la temperatura afectan a la inmunidad y el procesamiento abre nuevas opciones a la hora de optimizar la cría comercial de grillos. Uno de los principales problemas de la cría de insectos es que son animales ectotermos (Moeller *et al.* 2020), por lo que el control de la temperatura es un factor decisivo en el desarrollo de su ciclo de vida. En determinados países (con clima muy frío o muy caliente) subir o bajar la temperatura de un habitáculo para la cría de insectos puede suponer un ahorro considerable de energía y dinero, por lo que sería interesante ver hasta qué punto es viable reducir o aumentar las temperaturas con respecto al costo-beneficio de los insectos considerando que no hay cambios sustanciales en su microbiota.

5. CONCLUSIONES

La temperatura de cría y mantenimiento de los grillos ha influido en la composición de la microbiota intestinal, por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada. En la muestra mantenida a 30°C se detectaron bacterias que no estaban en las muestras mantenidas a 20°C. Se ha observado una mayor mortalidad en la muestra man-

tenida a 30°C, que, aunque se desconocen los factores que la provocan, es un dato relevante a tener en cuenta de cara a futuros experimentos.

6. FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 19908-GERM-15 de la Fundación Séneca (Gobierno Regional de Murcia, España) y por el proyecto Retos-Colaboración referencia RTC-20179- 5964-2 del Ministerio de Ciencia Investigación y Universidades.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN. *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a los riesgos microbiológicos y alergénicos asociados al consumo de insectos* (AECOSAN-2018-001). https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/CONSUMO_INSECTOS.pdf
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 50(5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>
- Bermingham, E. N., Maclean, P., Thomas, D. G., Cave, N. J., & Young, W. (2017). Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ*, 5, e3019. <https://doi.org/10.7717/peerj.3019>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Ferguson, L. V., Dhakal, P., Lebenzon, J. E., Heinrichs, D. E., Bucking, C., & Sinclair,

- B. J. (2018). Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. *Functional Ecology*, 32(10), 2357–2368. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13153>
- Fernandez-Cassi, X., Söderqvist, K., Bakeeva, A., Vaga, M., Dicksved, J., Vagsholm, I., Jansson, A., & Boqvist, S. (2020). Microbial communities and food safety aspects of crickets (*Acheta domesticus*) reared under controlled conditions. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(4), 429–440. <https://doi.org/10.3920/jiff2019.0048>
- Guevara Larrea, B. L. (2017, noviembre). *Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra Ralstonia solanacearum, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella sp.* Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5968/1/IAD-2017-015.pdf>
- Ismail, N. A., Ragab, S. H., ElBaky, A. A., Shoeib, A. R., Alhosary, Y., & Fekry, D. (2011). Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Medical Science*, 3, 501–507. <https://doi.org/10.5114/aoms.2011.23418>
- Jung, J., Heo, A., Park, Y. W., Kim, Y. J., Koh, H., & Park, W. (2014). Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 888–897. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05016>
- Jongema, Y. (2017). List of edible insects of the world. Wageningen University & Research, Wageningen, the Netherlands. https://www.wur.nl/upload_mm/8/a/6/0fdcf700-3929-4a74-8b69-f02fd35a1696_Worldwide%20list%20of%20edible%20insects%202017.pdf
- Kim, Y. H., & Milner, J. A. (2007b). Dietary Modulation of Colon Cancer Risk. *Journal of Nutrition*, 137(11), 2576S-2579S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2576s>
- Méndez-Salazar, E. O., Ortiz-López, M. G., Granados-Silvestre, M. D. L. N., Palacios-González, B., & Menjivar, M. (2018). Corrigendum: Altered gut microbiota and compositional changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican undernourished and obese children. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02693>
- Meticulous Market Research Pvt. Ltd. (2019). *Edible Insects Market Worth \$7.96 Billion by 2030- Exclusive Report by Meticulous Research@*. GlobeNewswire News Room. <https://www.globenewswire.com/news-release/2019/09/24/1919753/0/en/Edible-Insects-Market-Worth-7-96-Billion-by-2030-Exclusive-Report-by-Meticulous-Research.html>
- Moeller, A. H., Ivey, K., Cornwall, M. B., Herr, K., Rede, J., Taylor, E. N., & Gunderson, A. R. (2020). The lizard gut microbiome changes with temperature and is associated with heat tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17). <https://doi.org/10.1128/aem.01181-20>
- Mukhopadhyay, I., Hansen, R., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2012). IBD—what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(4), 219–230. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.14>
- Ng, S. H., Stat, M., Bunce, M., & Simmons, L. W. (2018). The influence of diet and environment on the gut microbial community of field crickets. *Ecology and Evolution*, 8(9), 4704–4720. <https://doi.org/10.1002/ece3.3977>
- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., & Gopinath, P. M. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Published. <https://doi.org/10.5772/62329>
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>

- Santo Domingo, J. W., Kaufman, M. G., Klug, M. J., Holben, W. E., Harris, D., & Tiedje, J. M. (1998). Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Molecular Ecology*, 7(6), 761–767. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00390.x>
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Smith, C. J., Rocha, E. R., and Paster, B. J. (2006). The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease. *Prokaryotes* 7, 381–427.
- Tinker, K. A., & Ottesen, E. A. (2016). The core gut microbiome of the American cockroach, *Periplaneta americana*, is stable and resilient to dietary shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6603–6610. <https://doi.org/10.1128/aem.01837-16>
- Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2022/188 de la Comisión de 10 de febrero de 2022 por el que se autoriza la comercialización de las formas congelada, desecada y en polvo de *Acheta domestica* como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión. «DOUE» núm. 30, de 11 de febrero de 2022, páginas 109 a 114
- Wynants, E. (2019). *Microbiological dynamics and safety risks during rearing of insects for food and feed*. PhD thesis. Disponible en: <https://lirias.kuleuven.be/2379701?limo=0>