

Implementación de una estrategia de espectrometría de doble masa MALDI TOT/TOF para la identificación molecular de bacterias del intestino de trips del banano

Implementation of a dual mass spectrometry strategy MALDI TOF/TOF for the molecular identification of intestinal bacteria of banana thrips

Néstor D. Díaz-Castillo^{1,*}, Dicson Sánchez Abad²,
Mercedes T. Oyola Medina², Pedro Masías Ramirez²,
R. García-Seminario¹, Virna Cedeño Escobar², Eric Mialhe²

Resumen

Los insectos plaga, conocidos como trips del banano (*Chaetanaphothrips signipennis* y *Frankliniella parvula*), vienen causando serios daños económicos al sector bananero de la costa norte del Perú. Una interesante y prometedora estrategia de control biológico de estos insectos, es el desequilibrio de su microbiota intestinal mediante antagonistas nativos. Se evaluó la técnica MALDI (Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz) acoplada a un analizador TOF/TOF (tiempo de vuelo/doble vuelo) utilizada en espectrometría de masas, basada en la proteómica para la identificación de bacterias aisladas del intestino de los trips del banano. Se identificaron las bacterias *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baylyi* a partir de las secuencias peptídicas de los extractos celulares de estas cepas bacterianas, las cuales fueron previamente identificadas en base a la secuencia parcial del gen del ADN ribosómico 16S. La técnica MALDI TOF/TOF se constituye en una herramienta altamente potente, rápida, precisa y de bajo costo para la identificación de la microbiota intestinal de insectos.

Palabras clave: *C. signipennis*; *F. parvula*; péptidos; ADNr; 16S.

Abstract

Pest insects, known as banana thrips (*Chaetanaphothrips signipennis* and *Frankliniella parvula*), are causing serious economic damage to the banana sector on the northern coast of Peru. An interesting and promising strategy for the control of insect pests is the imbalance of their intestinal microbiota through native antagonists. The MALDI (Desorption / ionization by Matrix-Assisted Laser) technique coupled to a TOF / TOF (time-of-flight / double-flight) analyzer used in mass spectrometry, based on proteomics for the identification of bacteria isolated from the intestine of the banana thrips. The bacteria *Serratia marcescens* and *Acinetobacter baylyi* were identified from the peptide sequences of the cell extracts of these bacterial strains, which were previously identified based on the partial sequence of the 16S ribosomal DNA gene. The MALDI TOF / TOF technique is a highly powerful, fast, accurate and low cost tool for the identification of the intestinal microbiota of insects.

Key words: *C. signipennis*; *F. parvula*; peptides; rADN; 16S.

¹ Universidad Nacional de Tumbes, Av. Universitaria s/n-Pampa Grande-Tumbes

² Inca'Biotec, Jr. Filipinas 212-Tumbes

* Autor correspondiente: nestordiazcastillo1@gmail.com (N. Díaz-Castillo).

Introducción

El cultivo de banano (*Musa sapientum* L.) orgánico en el Perú se caracteriza por ser un producto alternativo alimenticio en la población y un importante generador de ingresos económicos. En el año 2014 la producción de banano se situó alrededor de 5500 ha, de las cuales cerca del 4% se concentró en las regiones septentrionales de Piura, Tumbes y Lambayeque (FAO, 2016), siendo los destinos de la fruta, Estados Unidos, Países bajos, Alemania, Bélgica, Corea del Sur, Finlandia y Japón. Aunque, en la última década, la producción de banano orgánico aumentó en un 94%, en la actualidad viene siendo perjudicada por los insectos plaga conocidos como “trips del banano” (*C. signipennis* y *F. parvula*), que pueden llegar a reducir hasta el 30% de la producción (MINAGRI, 2017).

El control de estos insectos se realiza a base de productos químicos, que, si bien los elimina total o parcialmente, trae consigo problemas colaterales de contaminación a los ecosistemas y riesgo para la salud de los seres vivos. Una alternativa para reducir el uso de plaguicidas es el control con microorganismos asociados a ellos. Los trips, así como la mayoría de otras especies polífagas coexisten con bacterias simbiotas (De vries *et al.*, 2001a; Engel y Moran, 2013 y Brune, 2014), que juegan roles importantes durante todo su ciclo de vida, sobre todo en aspectos relacionados con la alimentación (Kim *et al.*, 2007 y Arias-Cordero *et al.*, 2012), desarrollo (Emery *et al.*, 2017) protección (Eleftherianos *et al.*, 2013 y Acuña *et al.*, 2012), evolución (Kumm y Moritz, 2008) y reproducción (Dickey *et al.*, 2014).

El estudio de la diversidad bacteriana intestinal de insectos se ha caracterizado e identificado molecularmente en base a técnicas dependientes e independientes de medio de cultivo, mediante la secuencia del gen del ADN ribosómico 16S, y recientemente por técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), que constituye un método rápido y de bajo costo para analizar la composición de las

comunidades microbianas sin necesidad de cultivar microorganismos (Singhal *et al.*, 2015; Clark *et al.*, 2013).

Actualmente, la técnica MALDI (Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz) acoplada a un analizador TOF/TOF (tiempo de vuelo/doble vuelo) utilizada en espectrometría de masas, viene emergiendo como una herramienta potencial que permite identificar microorganismos y analizar biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

El análisis se realiza colocando la muestra mezclada con una matriz orgánica sobre una placa MALDI conductora para lograr una co-cristalización muestra-matriz. La placa metálica se introduce en el espectrómetro de masas, en donde la mezcla es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser provocando que la matriz absorba esta energía y la convierta en energía de excitación y transferencia de iones a los analitos presentes en las muestras. El área tratada se calienta y se provoca la desorción de iones de fase sólida a gaseosa seguida por la ionización de la muestra con mínima fragmentación (por ello se denomina “ionización suave”). Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (*peptide mass fingerprinting*) (Clark *et al.*, 2013). Esta investigación tuvo como propósito, identificar molecularmente la microbiota bacteriana y su composición peptídica presente en el intestino de los trips del banano mediante la técnica MALDI TOF/TOF MS.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Especímenes de insectos trips de las especies *Chaetanaphothrips signipennis* y *Frankliniella parvula* fueron recolectados en sus diversos estados de desarrollo (ninfa y adulto) en hojas y flores de las plantas de banano cultivadas en el Centro Experimental “Los Cedros”, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en Distrito de la Cruz, provincia y Región de Tumbes en las coordenadas UTM 551886.64 m E y 9600413.30 m S.

Aislamiento e identificación de bacterias del intestino de los trips del banano

Previo al aislamiento de la microbiota intestinal de los insectos adultos y ninfas se hizo una desinfección de la microbiota externa, para lo cual se depositaron los insectos en tubos eppendorf con 1 ml de etanol 70% por 3 min; luego se retiró el etanol y se adicionó NaClO al 2% por 30 s, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril. Los especímenes fueron puestos en medio de cultivo LB caldo por 48 horas. Se transfirieron 20 µl de caldo LB a una caja petri con agar LB, y después de 72 horas se hicieron evaluaciones para comprobar la no presencia de microorganismos.

En tubos Falcon se trituraron los insectos con un macerador quirúrgico estéril (para liberar la microbiota intestinal) y se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de agua destilada. Se tomaron 20 µl de las muestras y se esparcieron en cajas petri con medio de cultivo TSA e incubadas por 24 horas, las colonias bacterianas fueron purificadas y posteriormente cultivadas en caldo LB por 24 horas.

Extracción de ADN de las bacterias aisladas del tracto digestivo de los trips del banano

Las cepas bacterianas puras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de

solución tampón TE (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA). Las bacterias fueron sometidas a una lisis celular por adición de 30 µl de SDS (10%) y 3 µl de proteínasa K (37 °C, 1 hora), se añadió 100 µl de NaCl (5M) y 80 µl de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65 °C) y se incubaron a 65 °C por 10 min. Posteriormente, se adicionó cloroformo/alcohol isoamil (24:1) y tras centrifugarse a 13 mil rpm por 5 min, se añadió 0,6 ml de isopropanol, volviéndose a centrifugar a 1200 rpm por 5 min, se descartó al sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1ml de etanol frío, y nuevamente se centrifugó a 12 mil rpm 5 min, se eliminó el etanol mediante secado a temperatura ambiente por 5 min, y se obtuvo los ácidos nucleicos a los cuales se les adicionaron 30 µl de tampón TE y 1 µl de solución de RNasa a 37 °C por 1 hora para eliminar el ARNs y obtener el ADN puro.

Amplificación del gen del ADN ribosómico 16S por PCR

La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C 6 min, 35 ciclos 94 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min, y una extensión final de 72 °C 4 min. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y visualizado bajo luz UV, después del teñido con bromuro de etidio. La amplificación por PCR del gen del ADN ribosómico 16S se hizo utilizando Primers universales de bacterias: primer Forward 27F (5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') y primer Reverse 1492R (5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'). El volumen final de reacción fue de 25 µl conteniendo los siguientes reactivos: 2,5 µl de Buffer 10X, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl dNTPs 10 mM, 0,6 µl de cada primer (15 pmol), 0,1 Taq Pol, 16,2 µl AUP, 2 µl del templado.

Obtención de la secuencia parcial del gen del ADN ribosómico 16S

La secuenciación nucleotídica se hizo con primers internos 16S ADNr 518F y 16S

ADNr 800R, obteniéndose secuencias nucleotídicas, las cuales fueron analizadas con el software BLAST utilizando la base de datos del 16S ADNr del GEN BANK y el programa MEGA 6. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information - USA).

Identificación de péptidos

Se seleccionaron las bacterias, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baylyi*, obtenidas del intestino de los trips, *F. parvula* y *C. signipennis*, respectivamente. Las cepas bacterianas fueron cultivadas individualmente en tubos eppendorf conteniendo caldo LB, después de 72 horas se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min y el sedimento congelado a -20°C 30 min; posterior al descongelado se le adicionó 100 µl de Buffer nativo lisis, agitándose suavemente; se sónico por 5 min y se incubó en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm por 30 min a 4 °C, obteniéndose la fracción soluble de las proteínas bacterianas en el sobrenadante.

Las proteínas fueron migradas en gel de bisacrilamida SDS-PAGE al 12% en un búfer de corrida (12% de acrilamida; 0,38 M Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,04% TEMED hasta un volumen final de 5 ml), teñido con bromuro de Etidio (10 mg/ml) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las muestras se prepararon mezclando 30 µl de proteínas con 20 µl de *loading protein buffer* y se colocaron en el gel y migrado durante 3 horas a 90 voltios y 50 amperios.

El gel fue fijado en metanol al 50% y teñido en 0,1% azul de Coomassie. Las bandas de proteínas diferenciadas fueron cortadas con un bisturí estéril, decoloradas con 100 µl de bicarbonato de amonio y 100 Mm/acetronitrilo (1:1) e incubadas por 30 min, seguido por una segunda incubación a Temperatura ambiente con 500 µl de acetronitrilo concentrado hasta que las piezas se decoloraron completamente. Posteriormente, las bandas de proteínas fueron digeridas e incubadas en buffer tripsina (13 ng/µl) en dos tiempos: primero por 2 horas a -4 °C, y luego a 37 °C por 4 h.

La extracción de péptidos de las proteínas se realizó en buffer de extracción (1:2 de ácido fórmico 5%/acetronitrilo) y su posterior incubación a 37 °C por 15 minutos. Se sónico 5 min y luego del secado en bomba al vacío. Se resuspendió en 3 µl de agua grado HPLC con 0,1% TFA. Finalmente, se espoteó en una placa maldi opti -TOF 1-1 V/V con 10 mg/ml de la matriz CHCA (ácido cyano-4-hidroxycinámico).

El análisis de los péptidos de las cepas bacterianas se realizó con un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF™- AB SCIEX 5800 en modo ion reflector positivo con intensidad de láser de 2800 HZ y velocidad de 600 µm/s en un rango de masas entre 600 a 4000 m/z. El procesamiento de datos fue realizado mediante el software ProteinPilot™, utilizando las secuencias de aminoácidos descargadas a partir de la base de datos UNIPROT (Universal Protein Resource).

Resultados y Discusión

Aislamiento e identificación molecular de bacterias

El aislamiento y posterior identificación molecular de las bacterias del intestino de individuos adultos y ninfas de trips, ha dado como resultado, la obtención de nueve cepas bacterianas de *F. parvula* en el estadio ninfal, predominando el género *Pantoea* con siete especies; en tanto, que

en el estadio adulto se encontraron cinco cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Serratia* y *Acinetobacter* (Tabla 1). En el trips *C. signipennis*, se identificaron veintiocho cepas bacterianas, correspondiendo tres al estadio ninfal y veinticinco al estadio adulto, destacando el género *Acinetobacter* con 14 especies (Tabla 2).

Tabla 1. Cepas bacterianas nativas cultivables, aisladas del intestino de *F. párvula*

Especie	Estadio	Cepa	Secuencia más cercana	Cod.. Absesión	% Identidad
<i>F. párvula</i>	Adulto	1M	<i>Acinetobacter soli</i>	GB859739.1	99
<i>F. párvula</i>		2M	<i>Serratia marcescens</i>	EU914257.1	99
<i>F. párvula</i>		3M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>		4M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>		5M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>F. párvula</i>		6M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>	Ninfa	7M	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.2	99
<i>F. párvula</i>		8M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		9M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		10M	<i>Serratia marcescens</i>	GQ465847.1	100
<i>F. párvula</i>		11M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		12M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		13M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>F. párvula</i>		14M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	100

Tabla 2. Cepas bacterianas nativas cultivables, aisladas del intestino de *C. signipennis*

Especie	Estadio	Cepa	Secuencia más cercana	Cod.. Absesión	% Identidad
<i>C. signipennis</i>	Ninfas	39M	<i>Serratia sp.</i>	KR058830.1	96
<i>C. signipennis</i>		40M	<i>Serratia sp.</i>	KF135458.1	92
<i>C. signipennis</i>		41M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KC900896.1	99
<i>C. signipennis</i>	Adultos	44M	<i>Erwinia sp.</i>	HQ154553.1	99
<i>C. signipennis</i>		45M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>C. signipennis</i>		46M	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		47M	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>C. signipennis</i>		48M	<i>Pantoea sp.</i>	KF514103.1	99
<i>C. signipennis</i>		49M	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.1	98
<i>C. signipennis</i>		50M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>C. signipennis</i>		51M	<i>Pantoea agglomerans</i>	GQ374472.1	100
<i>C. signipennis</i>		52M	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>C. signipennis</i>		53M	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>C. signipennis</i>		54M	<i>Acinetobacter sp.</i>	GQ478266.1	100
<i>C. signipennis</i>		55M	<i>Acinetobacter soli.</i>	AB859739.1	99
<i>C. signipennis</i>		56M	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		57M	<i>Pantoea dispersa</i>	AB273743.1	99
<i>C. signipennis</i>		58M	<i>Gamma proteobacterium</i>	LC007678.1	92
<i>C. signipennis</i>		59M	<i>Acinetobacter baylyi</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		60M	<i>Acinetobacter sp</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		61M	<i>Acinetobacter sp</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		62M	<i>Acinetobacter sp</i>	GQ478266.1	99
<i>C. signipennis</i>		63M	<i>Acinetobacter sp</i>	GQ478266.1	99
<i>C. signipennis</i>		64M	<i>Acinetobacter sp.</i>	JQ433924.1	99
<i>C. signipennis</i>		65M	<i>Pantoea cypripedii</i>	KC153127.1	99
<i>C. signipennis</i>		66M	<i>Erwinia sp.</i>	KF956604.1	99
<i>C. signipennis</i>		67M	<i>Erwinia sp.</i>	HQ154553.1	99
<i>C. signipennis</i>		68M	<i>Pantoea dispersa</i>	AB273743.1	99

Identificación de péptidos de cepas bacterianas

En este estudio se identificaron los péptidos procedentes de las cepas bacterianas *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baylyi*, obtenidas del intestino de los trips *F. parvula* y *C. signipennis*, respectivamente.

Se obtuvieron quince secuencias peptídicas con una homología del 99%. Los péptidos se determinaron con rapidez y

precisión en base a la detección de picos específicos en los espectros de masas (Fig. 1 y 2), correspondiendo, ocho proteínas a *Serratia marcescens* (m/z 2062.076, 1597.874, 3559.564, 1957.994, 1969.944, 2729.353, 1876.776, 1344.67) (Tabla 3) y siete a *Acinetobacter baylyi* (m/z 1.066.604, 22.200.359, 20.540.601, 1.455.656, 2188.46, 1779.78, 1544.43) (Tabla 4).

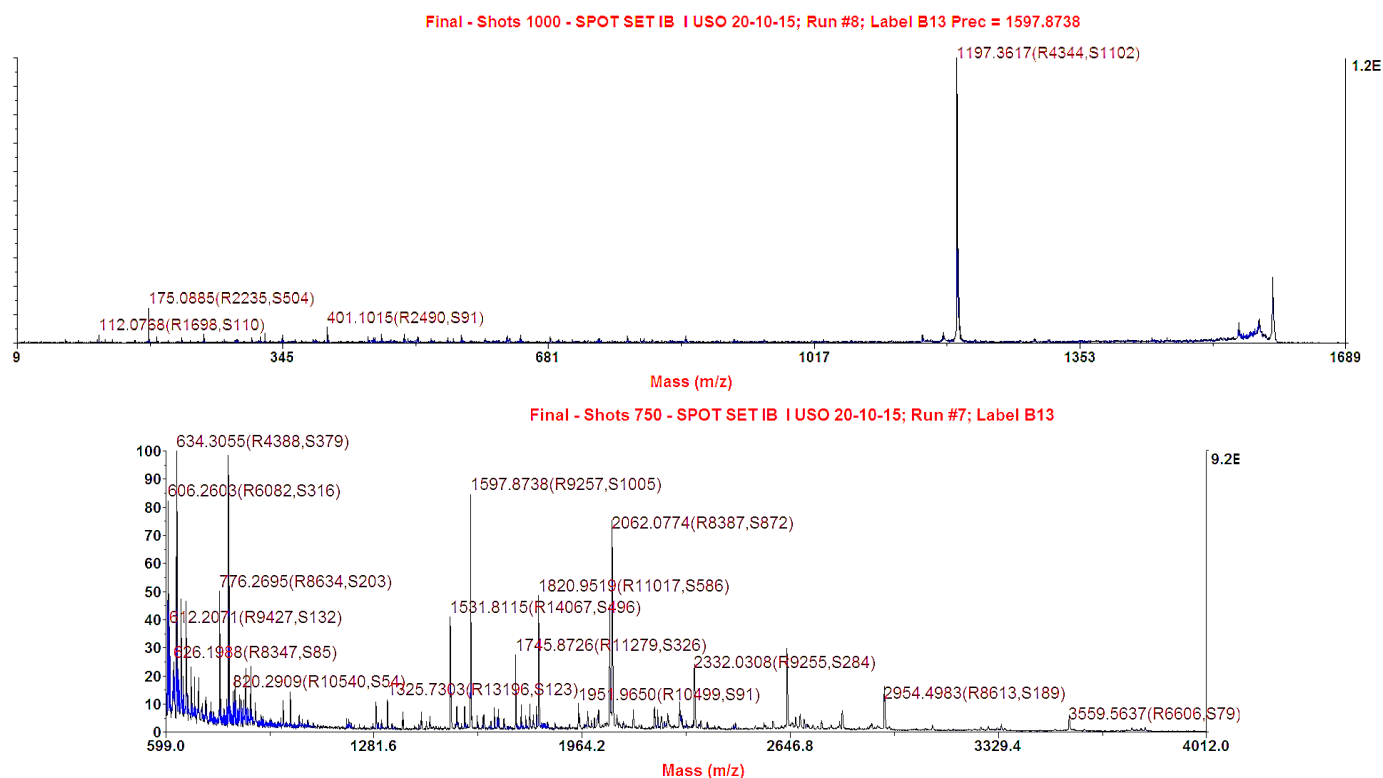


Figura 1. Mapa de distribución de las secuencias peptídicas en la cepa bacteriana *Serratia marcescens* aislada del intestino de *F. parvula*. Espectro de masas del Ion precursor en primer TOF (superior) y espectro de masas refragmentado en TOF/TOF (inferior).

Tabla 3. Péptidos identificados en la bacteria *Serratia marcescens*, mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

Prec. MW	Prec. m/z	Mejor secuencia	Proteína	Confiabilidad (%)
2061.07	2062.076	IHAEVPLSEMFGYATQLR	Elongación factor G	99
1596.867	1597.874	IATDPFVGNLTFFR	Factor de elongación de traducción G	99
3558.557	3559.564	AINWNEEDAGVTFEYE DVPADMMELAEWR	FAD-dependiente de óxido reductasa	99
1956.987	1957.994	IIEIAEALDSYIPEPER	Factor de elongación EF-Tu	99
1968.938	1969.944	FIEQDPEGQYGLEAAFR	DNA-directo RNA polimerasa sub unidad beta	99
2728.346	2729.353	GTSDGLRRGLAVTDLQ HPIEVPVGKATL	ATP sintasa beta sub unidad	99
1876.756	1876.776	EGKVHEQTYKHGEPQAP LKVVGETDQTGT	DNA girasa	99
2061.0696	2062.0769	SLEEVKDSVSSSYLQMR	RNA polimerasa	99

Tabla 4. Péptidos identificados en la bacteria *Acinetobacter baylyi*, mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

Prec. m/w	Prec. m/z	Mejor secuencia	Proteína	Confiabilidad (%)
1.065.597	1.066.604	AMQATMLER	Peptide deformylase	99
2.219.029	22.200.359	CDLVDDDEELLELVEMEV	Elongation factor Tu	99
2.053.053	20.540.601	INVIDTPGHVDFTIEVER	Elongación factor G	99
1.455.645	1.455.656	MNPNSFQFKENILQFFSVHD	PHA synthase	99
2180.33	2188.46	MKDVVIVAAKRTAIGSFLGSLASL SAPQLGQTAIRA	beta-ketothiolase	99
1779.66	1779.78	MNPNSFQFKENILQFFSVH	PHA synthase	99
1544.32	1544.43	YKIIATVVPREEDREKQWLQ	Acetoacetyl -CoA reductasa	99

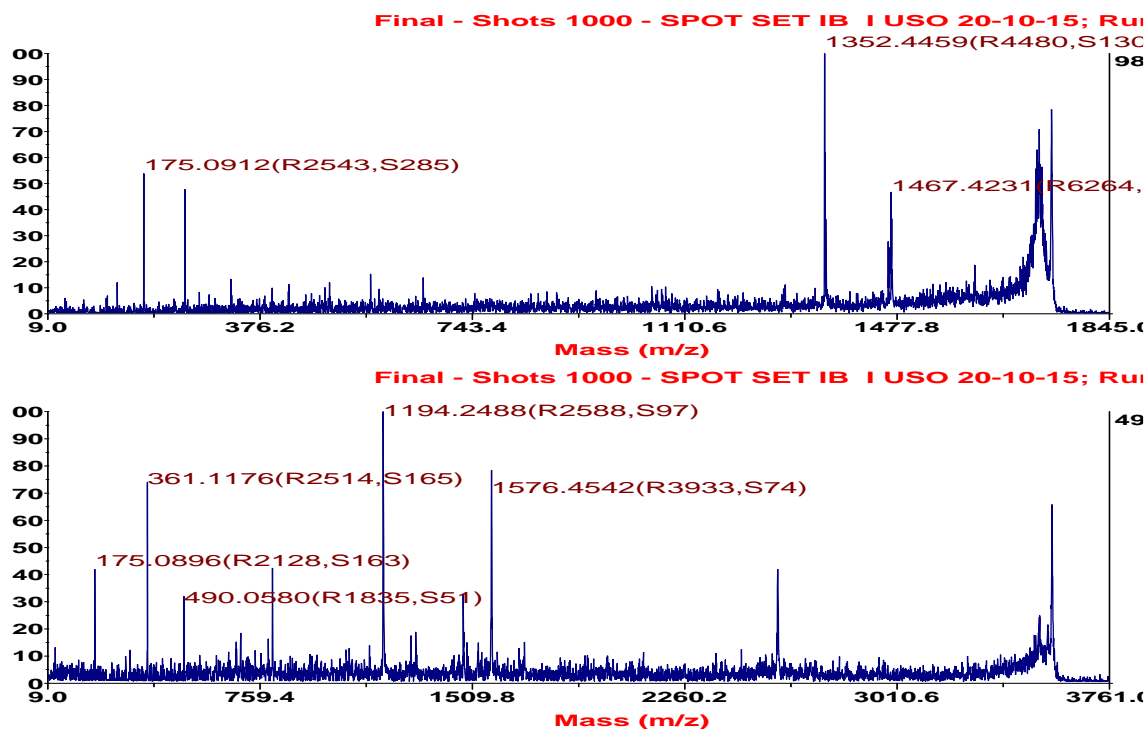


Figura 2. Mapa de distribución de las secuencias peptídicas en la cepa bacteriana *Acinetobacter baylyi*, aislada del intestino de *C. signipennis*. Espectro de masas del Ion precursor en el primer TOF (superior) y espectro de masas refragmentado en TOF/TOF (inferior).

Del intestino de los trips del banano se identificaron catorce cepas bacterianas de *S. marcescens* y *A. baylyi*. En los estadios ninfal y adulto de ambas especies de insectos prevalecen los géneros *Acinetobacter*, *Pantoea* y *Serratia*, las cuales han sido referenciadas por De Vries (2001b), como simbioses obligados permanentes, que pueden transmitirse a nuevas generaciones de manera transovárica. Sin embargo, hay una significativa diferencia en el número de especies, que podría deberse a diversos factores, entre ellos el tipo de alimento, *F. parvula* se alimenta de flores, mientras que *C. signipennis* lo hace de frutos de banano. Diversos estudios han valorado el desempeño del MALDI-TOF MS para identificar cepas bacterianas aisladas en medios de cultivo, con porcentajes de homología superiores al 90% frente a los métodos convencionales de identificación (Van Veen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). Los microorganismos presentan en su composición química una serie de proteínas de origen ribosómico en el rango de masas de 2-20 kDa, que generan espectros de masas que son específicas de género y especie (Patel, 2013; Petti *et al.*,

2011). Un estudio realizado por Valentine *et al.* (2005), demostró que este conjunto básico de proteínas permanece constante y permiten la identificación de los microorganismos.

En ese contexto, nuestro estudio, también estuvo dirigido a identificar secuencias peptídicas que conforman las proteínas en las bacterias, *S. marcescens* y *A. baylyi*, a través de la determinación de los espectros de MS/MS producidos por el TOF-TOF y analizadas con la base de datos del ProteinPilot™ Software 4.0. Se obtuvieron quince secuencias peptídicas con una homología superior a 99%, que correspondieron a ocho proteínas de *S. marcescens* y siete a *A. baylyi*. Luis (2016) identificó dos proteínas pertenecientes a *Serratia marcescens* utilizando la misma técnica.

El éxito resultante a través de la precisión de la masa proporcionada por el espectrómetro, permite señalar el potencial de MALDI-TOF-TOF MS para identificar aislamientos de microorganismos mediante el análisis de conglomerados a partir de la obtención de espectros confiables y específicos.

Conclusiones

La espectrometría de doble masa MALDI TO/TOF ha permitido una identificación molecular, extremadamente rápida y precisa, basada en las determinaciones de espectros de masas de secuencias

peptídicas específicas de las bacterias *S. marcescens* y *A. baylyi* aisladas del intestino de los trips del banano, *F. parvula* y *C. signipennis*, respectivamente.

Referencias Bibliográficas

- Acuña, R.; Padilla, B.E.; Flórez-Ramos, C.P.; Rubio, J.D.; Herrera, J.C.; Benavides, P.; Lee, S.J.; Yeats, T.H.; Egan, A.N.; Doyle, J.J.; Rose, J. 2012. Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. *PNAS* 109(11): 4197–4202.
- Arias-Cordero, E.; Ping, L.; Reichwald, K.; Delb, H.; Platzer, M.; Boland, W. 2012. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (larvae and beetles) of the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS ONE* 7(12): e5155.
- Brune, A. 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews microbiology* 12: 168-180.
- Clark, A.E.; Kaleta, E.J.; Arora, A.; Wolk, D.M. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 26(3): 547-603.
- De Vries, E.J.; Jacobs, G.; Breeuwer, J.A. 2001a. Growth and transmission of gut bacteria in the Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 129–137.
- De Vries, E.J.; Breeuwer, J.A.; Jacobs, G. Mollema, C. 2001b. The association of Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 120–128.
- Dickey, A.M.; Trease, A.J.; Jara-Cavieres, A.; Kumar, V.; Christenson, M.K.; Potluri, L.P.; Morgan, J.K.; Shatters, R.G.; Mckenzie, C.L.; Davis, P.H.; Osborne, L.S. 2014. Estimating bacterial diversity in *Scirtothrips dorsalis* (thysanoptera: thripidae) via next generation sequencing. *Florida Entomologist* 97(2): 362–366.
- Engel, P.; Moran, N.A. 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37: 699–735.
- FAO. 2016. Producción de banano orgánico en Perú. Disponible en: <http://www.fao.org/world-banana-forum/projects/good-practices/organic-production-peru/es/>
- Kim, J.M.; Choi, M.Y.; Kim, J.W.; Lee, S.A.; Ahn, J.H.; Song, J.; Kim, S.H.; Weon, H.Y. 2007. Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two Cerambycidae species (Coleoptera). *Microbiology* 55(1): 21–30.
- Eleftherianos, I.; Atri, J.; Accetta, J.; Castillo, J.C. 2013. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? *Front Physiol.* 2013; 4: 46.
- Emery, O.; Schmidt, K.; Engel, P. 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular ecology* 26(9): 2576-2590.
- Kumm, S.; Moritz, G. 2008. First detection of *Wolbachia* in arrhenotokous populations of thrips species (Thysanoptera: Thripidae and Phlaeothripidae) and its role in reproduction. *Environ Entomol* 37(6): 1422-8.
- MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego. 2017. Boletín Estadístico de producción. [on-line]. En: <http://www.minagri.gob.pe/pdf/boletines>
- Patel, R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 57(4). 564–72.
- Petti, C.A.; Weinstein, M.P.; Carroll, K.C. 2011. Systems for Detection and Identification of Bacteria and Yeasts. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: ASM Press; p. 15–26.
- Valentine, N.; Wunschel, S.; Wunschel, D.; Petersen, C.; Wahl, K. 2005. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 71(1): 58-64.
- Singhal, N.; Kumar, M.; Kanaujia, P.K.; Viridi, J.S.M.A. 2015. LDI-TOF mass spectrometry:

- an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6: 791.
- Van Veen, S.Q.; Claas, E.C.J.; Kuijper, E.J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 48(3): 900-907.
- Wang, W.; Xi, H.; Huang, M.; Wang, J.; Fan, M.; Chen, Y. 2014. Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. *J Thorac Dis.* 6(5): 524–533.