

## ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DEL INSECTO *TENEBRIO MOLITOR* EN DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ Y CON DOS DIETAS BASADAS EN SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Study of the microbiota of the insect *Tenebrio molitor* in different light conditions and with two diets based on by-products from the food industry

**Antonio Ángel-Sánchez<sup>1</sup> y José Galián<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

<sup>2</sup>ArthropoTech S.L., Edificio Vitalis, 2<sup>a</sup> planta, Despacho 2.15, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

**Autor para correspondencia:** Antonio Ángel-Sánchez: antonio.angels@um.es

Tipo artículo: Trabajo Fin de Grado

Enviado: 3 agosto 2022

Aceptado: 18 octubre 2022

### RESUMEN

La microbiota intestinal de los insectos se puede definir como la comunidad de microorganismos que viven en el tracto intestinal, y que realiza funciones básicas en los procesos digestivos y del sistema inmune. El objetivo de este estudio es analizar la microbiota de larvas de *Tenebrio molitor*, insecto autorizado para su consumo en la UE, en distintas condiciones de luz y con dos dietas. Se estudia el efecto en la microbiota al someterse a luz continua, fotoperiodo, oscuridad continua y luz roja continua, y dos dietas diferentes a base de subproductos de la industria alimentaria, una compuesta por 80% de brócoli y 20% de avena, y otra de 80% de posos de café y 20% de avena.

En todos los tratamientos predominan los filos Tenericutes, Proteobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria; y en menor proporción, Bacteroidetes y Actinobacteria.

Como conclusión, se determinó que diferentes condiciones de luz no muestran variación en la composición bacteriana de *T. molitor*, sin embargo, distintas dietas modifican su microbiota intestinal. En la dieta de brócoli predominan Tenericutes (media de 41,9%) y Firmicutes (31,3%), mientras que en la de posos de café son maritimas bacterias del filo Proteobacteria (62%).

**Palabras clave:** posos de café, brócoli, luz continua, fotoperiodo, oscuridad continua, luz roja continua.

## ABSTRACT

The intestinal microbiota of insects can be defined as the community of microorganisms living in the intestinal tract, which performs basic functions in digestive and immune system processes. The objective of this study is to analyze the microbiota of *Tenebrio molitor* larvae under different light conditions and with two different diets. The effect on the microbiota when subjected to continuous light, photoperiod, constant darkness and continuous red light, and two different diets based on by-products of the food industry, one composed of 80% broccoli and 20% oats, and the other of 80% spent coffee grounds and 20% oats, are studied.

In all treatments, the phyla Tenericutes, Proteobacteria, Firmicutes and Cyanobacteria predominated; and in smaller proportions, Bacteroidetes and Actinobacteria.

As a conclusion, it was determined that different light conditions do not show variation in the bacterial composition of *T. molitor*, however, different diets modify their intestinal microbiota. The broccoli diet was dominated by Tenericutes (mean 41,9%) and Firmicutes (31,3%), while the spent coffee grounds diet was dominated by bacteria of the Proteobacteria phylum (62%).

**Key words:** spent coffee grounds, broccoli, continuous light, photoperiod, continuous darkness, continuous red light.

## INTRODUCCIÓN

Como fuente de alimento, los insectos son utilizados por varios tipos de animales (Ravzanadii *et al.*, 2012), y durante siglos, han sido parte de la dieta de humanos, sobre todo en la cultura oriental (Siemianowska *et al.*, 2013). El consumo de insectos se conoce como “entomofagia”, y debido a su accesibilidad, valor nutricional y sabor, los insectos están adquiriendo un papel importante en la dieta. Los insectos son ricos en proteínas, grasas, minerales, vitaminas y fibra (Aguilar-Miranda *et al.*, 2001). Sin embargo, a medida que la población crece, es necesario considerar una producción de alimentos alternativa que no requiera mucho aporte de energía, espacio, ni genere productos de desecho y gases de efecto invernadero, típicos de la producción animal convencional (Siemianowska *et al.*, 2013).

*T. molitor*, insecto autorizado para su consumo, es una de las especies más importantes para la conversión de biomasa en proteínas

(Grau *et al.*, 2017), mayor que la de grandes animales (Ramos-Elorduy *et al.*, 2002; Siemianowska *et al.*, 2013).

El sistema digestivo de los insectos normalmente consiste en un tubo continuo que se extiende desde la boca al ano (Ben Guerrero, 2018), revestido por una capa continua de células epiteliales. Este órgano puede extraer y absorber los nutrientes de los alimentos ingeridos (Rajagopal, 2009).

El intestino tiene tres regiones principales dedicadas a procesos específicos: el intestino anterior, el intestino medio (o ventrículo) y el intestino posterior (Engel y Moran, 2013; Ben Guerrero, 2018).

El intestino de los insectos es un nicho ecológico rico en nutrientes en el que se encuentran microorganismos endosimbiontes (virus, bacterias, arqueas y eucariotas microscópicos como protozoos, hongos y nematodos), conocido como microbiota intestinal (Rajagopal, 2009; Vargas Jerez, 2012; Gupta y Nair, 2020).

Al igual que en mamíferos, la microbiota intestinal de insectos puede tener importantes funciones simbióticas, complementando la nutrición del hospedador, facilitando la descomposición de la dieta o proporcionando protección contra los patógenos (Schmidt y Engel, 2021).

Desde la perspectiva de la colonización microbiana, los intestinos de los insectos suelen presentar hábitats inestables, ya que mudan numerosas veces durante el desarrollo larvario (Engel y Moran, 2013). En los insectos holometábolos (como en *T. molitor*), se da una remodelación radical del intestino en la metamorfosis, modificando la microbiota intestinal (Engel y Moran, 2013; Schmidt y Engel, 2021).

La composición y actividad de la microbiota intestinal depende del genoma, nutrición y estilo de vida del hospedador, pudiendo adquirirse del entorno o con el alimento (Vargas Jerez, 2012; Schmidt y Engel, 2021). Esta es clave en su digestión, metabolismo y protección frente a patógenos (Poveda Arias, 2019).

*T. molitor* es miembro del orden Coleoptera, de la familia Tenebrionidae, que infesta los alimentos almacenados en malas condiciones (Ghaly y Alkoaik, 2009; Siemianowska *et al.*, 2013; Nito Loreto, 2019). Su larva, conocida como gusano amarillo de la harina, es una plaga característica del trigo, que se puede dar en granos almacenados y productos molidos como harinas, sobre todo en lugares oscuros como depósitos de grano, sacos de pienso, molinos, almacenes... (Aguilar-Miranda *et al.*, 2001; Ghaly y Alkoaik, 2009).

El ciclo de vida completo incluye: huevo, larva, pupa y adulto (Ghaly y Alkoaik, 2009).

El comportamiento de los insectos en los almacenes de grano se ve afectado por la interacción de muchos factores físicos, químicos y bióticos diferentes, conocido como tropotaxis. Entre estos factores se encuentran la intensidad de la luz, la temperatura, la humedad relativa, la disponibilidad de alimento, el contenido de humedad del grano, el tamaño y la variedad, el diseño y los materiales de construcción de los almacenes, las

perturbaciones por la densidad de los insectos y de otras especies (Nito Loreto, 2019).

#### – Temperatura y humedad ambiental

La temperatura corporal de la mayoría de los insectos está ligada a los cambios de la temperatura ambiente, ya que son organismos ectotermos (Resh y Cardé, 2009). Las temperaturas de cría óptimas de las larvas son de 25 a 28°C (Aguilar-Miranda *et al.*, 2001; Mendaza Lainez, 2017) y una humedad óptima de 60 a 75% (Mendaza Lainez, 2017).

#### – Intensidad de la luz

Los graneros y almacenes proporcionan un entorno oscuro o de bajo nivel de luz. *T. molitor*, muestra respuestas de fototaxis negativa a estos entornos, donde el movimiento es en la dirección contraria a la fuente de luz para mejorar su crecimiento (Balfour y Carmichael, 1928).

#### – Alimentación o medio de crecimiento

Suelen alimentarse con salvado o harina de cereales (trigo, avena, maíz) que contienen gran parte de los nutrientes necesarios, complementados con frutas y verduras frescas crudas (como zanahorias, patatas o lechuga) para proporcionar la humedad necesaria (Ghaly y Alkoaik, 2009; Mendaza Lainez, 2017; Nito Loreto, 2019). Sin embargo, las hortalizas son propensas a la desecación y enmohecimiento (Deruytter *et al.*, 2020).

No obstante, las larvas de *T. molitor* son resistentes a la desecación y sequedad. Aunque cuando hay una fuente húmeda, crecen más rápido, con una mejor tasa de conversión de alimento y de desarrollo, y un mayor tamaño corporal (Murray, 1968, Baek *et al.*, 2015; Nito Loreto, 2019; Deruytter *et al.*, 2020).

En este estudio, la selección de las dietas basadas en desechos de brócoli y posos de café se debe a que son subproductos de la industria alimentaria que pueden ser considerados como sustratos adecuados por su composición para la alimentación de *T. molitor*. La avena se utiliza como sustrato base.

El contenido porcentual de los componentes del cuerpo del insecto depende de la especie,

el clima, el hábitat y la alimentación (Siemianowska *et al.*, 2013). El contenido proteico de *T. molitor* en peso seco se sitúa en torno al 60%. El gusano amarillo contiene todos los aminoácidos esenciales necesarios para la nutrición humana (Ghaly y Alkoaik, 2009; Ravzanaadii *et al.*, 2012; Grau *et al.*, 2017). La composición de lípidos de las larvas en base seca es de un 30%. Los ácidos grasos predominantes son el oleico, linoleico y palmítico (20%, 8,5% y 7%, respectivamente) (Aguilar-Miranda *et al.*, 2001; Ravzanaadii *et al.*, 2012). También, cuentan con una gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados como el linoléico (ácido graso  $\omega$ -3) (Aguilar-Miranda *et al.*, 2001; Grau *et al.*, 2017). Además, tienen una gran cantidad de vitaminas esenciales y minerales (Poveda Arias, 2019).

En este trabajo se ha realizado una revisión sistemática. Una revisión sistemática utiliza métodos sistemáticos y reproducibles para identificar, seleccionar y valorar críticamente toda la investigación relevante sobre un determinado tema, y para recoger y analizar los datos de los estudios que se incluyen en la revisión. Para la búsqueda en esta revisión se siguió la declaración PRISMA 2020.

El objetivo principal de esta revisión es conocer de forma general los estudios relacionados con la microbiota de *T. molitor* que se ajusten a los objetivos de este estudio. Las fuentes de información donde los artículos fueron buscados son las bases de datos Google Académico, PubMed y Web of Science, para estudios publicados hasta el 6 de febrero de 2022.

La estrategia de búsqueda para estas bases de datos se modificó para cada una en función de sus términos y palabras clave para acotar los estudios encontrados:

– En Google Académico, las palabras clave para identificar los artículos de esta revisión fueron: “tenebrio molitor” AND (“microbiota” OR “microbiome” OR “gut microbiota” OR “gut microbiome”) AND (“bacterial community” OR “community composition”), limitando la búsqueda filtrando a partir de estudios publi-

cados en 2018, con el fin de reducir el número de resultados. Se encontraron 501 estudios.

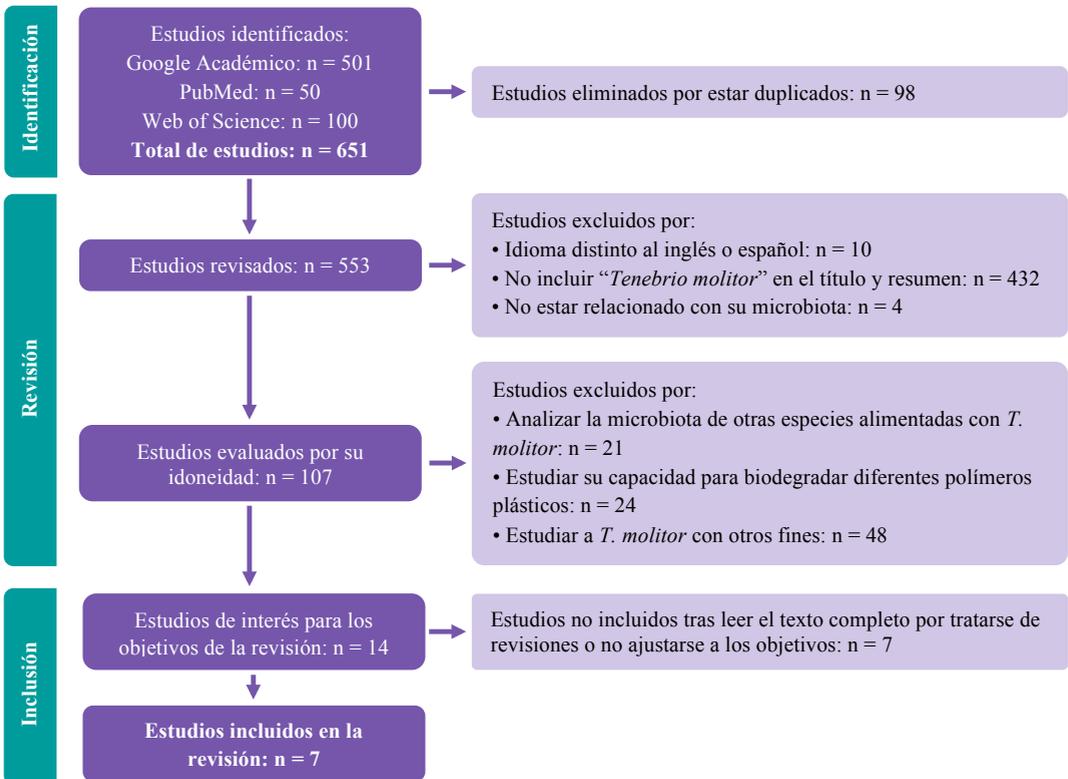
– En PubMed, la estrategia fue más simple, con las palabras clave: (tenebrio molitor) AND (microbiota), desde el inicio de la base de datos, sin limitar por fecha, ya que el número de resultados es notablemente más reducido (50 estudios).

– En Web of Science las palabras clave también fueron: “tenebrio molitor” AND “microbiota”, aplicando la búsqueda para el título, resumen y palabras clave desde el inicio de la base de datos. Se identificaron 100 estudios.

Todos los estudios fueron evaluados, se examinaron los títulos y los resúmenes, obteniéndose así los artículos completos pertinentes que fueron analizados y cribados sucesivamente atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión que se describen a continuación (Figura 1).

Criterios de inclusión: artículos que estudien y analicen la microbiota o composición microbiana, mediante diferentes métodos, de las larvas de *T. molitor*.

Criterios de exclusión: no se revisan aquellos artículos que no contengan “*Tenebrio molitor*” en su título y resumen, independientemente de si aparece en el resto del texto, pues se considera que no están centrados en el estudio de dicho insecto. Tampoco se incluyen aquellos en los que no se analice la microbiota intestinal, aunque sea un trabajo sobre el insecto en cuestión. No se tienen en cuenta estudios donde se analice la microbiota de otras especies animales (como pollos, peces u otros insectos) que hayan sido alimentadas con *T. molitor*. Debido a que *T. molitor* ha sido estudiado en numerosos artículos por su capacidad para degradar plásticos como polietileno, poliestireno, PVC... no se añaden dichos artículos porque no se ajustan a los objetivos de ser alimentados con subproductos alimentarios. Se excluyen, además, aquellos con otros fines no relacionados con el análisis de la composición microbiana intestinal. Por último, no se revisan artículos en idiomas diferentes al inglés o castellano.



**Figura 1.** Esquema de la revisión sistemática sobre la microbiota de *T. molitor*.

En un estudio de Jung *et al.* (2014), en el que se analizó la comunidad bacteriana del intestino de las larvas de *T. molitor*, alimentadas con tierra y salvado (proporción 1:1) durante 5–10 días, y se evaluó el efecto de los antibióticos ampicilina y kanamicina en la microbiota, se encontró que una de las muestras estaba formada principalmente por: Tenericutes (36,6%), Proteobacteria (34,1%) y Firmicutes (26,2%). En cuanto a los géneros, *Spiroplasma* (38,7%) fue el más predominante, seguido de las especies de Enterobacteriaceae no clasificadas (36,4%). Concluye que *Spiroplasma* se trata de un miembro común de la microbiota intestinal de los insectos. No actúa como patógeno, sino que es específico de *T. molitor*. En cuanto al efecto de los antibióticos no se

vio que afectaran significativamente a la microbiota.

En la comparación de especies bacterianas asociadas a cuatro partes diferentes del intestino de las larvas de *T. molitor*, y alimentadas con salvado de trigo y varios vegetales durante 1–2 meses, realizado por Wang y Zhang (2015), se obtuvo que las especies pertenecían a tres filos: Firmicutes, Tenericutes y Proteobacteria. *Spiroplasma* representaba también un gran porcentaje. Se encontraron diferencias en el contenido bacteriano de las diferentes regiones del intestino.

El salvado de trigo complementado con vegetales, como la zanahoria, es también la dieta empleada durante 24 horas en el estudio de Wynants *et al.* (2017), para evaluar el efecto sobre la microbiota de la inanición y el lavado al final

del periodo de cría de las larvas de *T. molitor*. Los principales filos fueron Proteobacteria y Firmicutes, seguidos de Tenericutes (67,86%, 24,67% y 5,67%, respectivamente). Como conclusión se determinó que la alimentación y el entorno de cría influyen en la comunidad microbiana del intestino, pero no lo hacen los tratamientos de inanición y/o lavado.

Los tres filos bacterianos dominantes en la microbiota de *T. molitor* de un estudio de Garofalo *et al.* (2017) son: Tenericutes (44,2%), Proteobacteria (39,22%) y Firmicutes (13,09%), mientras que Fusobacteria (3,3%), Bacteroidetes (0,13%) y Actinobacteria (0,06%) solo se encontraron con poca abundancia. El género *Spiroplasma* es el más abundante (44,1%).

Otro estudio en el que se caracteriza la microbiota de dos especies: larvas de gusanos de la harina y saltamontes comestibles frescos, por Stoops *et al.* (2016), se obtuvieron como filos predominantes: Proteobacteria (35,9%), Firmicutes (31,1%) y Actinobacteria (26,9%). Además, se detectaron Bacteroidetes (2,9%) y Streptophyta (0,5%). En las larvas, *Propionibacterium* sp. representó la especie más abundante (22,2%). Se determinó que la composición de la comunidad bacteriana difería entre ambas especies de insectos.

Se encontraron diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre diferentes empresas de cría por Vandeweyer *et al.* (2017). En este estudio, además, se compara con la composición de la comunidad bacteriana de grillos. Los gusanos de la harina mostraron una mayor abundancia relativa de Proteobacteria (57%) y Tenericutes (23%), dominadas por especies de *Spiroplasma* y *Erwinia*, albergando comunidades bacterianas diferentes a los grillos.

Osimani *et al.* (2018) en su estudio sobre la microbiota de las larvas de *T. molitor* de una cadena de producción piloto alimentadas con harina de trigo ecológico, se determinaron tres grupos microbianos dominantes: *Enterococcus*, *Lactococcus* y Enterobacteriaceae, que juntos representan el 87% del total. Las enterobac-

terias estaban compuestas principalmente por cinco géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Trabulsia* y *Erwinia*. Los entomoplasmales (incluido *Spiroplasma*) constituyeron una fracción importante de la microbiota de un lote de larvas. La microbiota revelada destacó la presencia de muchas especies con actividad simbiótica o potencialmente patógena.

Por otro lado, en cuanto al efecto de la luz en la microbiota de otros animales, se ha estudiado principalmente en mamíferos como ratas y aves, aunque existen pocos artículos.

Según el estudio de Jiang *et al.* (2020), se analizó la luz artificial nocturna o contaminación lumínica en el gorrión *Passer montanus*, donde se observó que esta afectaba a la composición taxonómica, la diversidad de especies y la estructura comunitaria de la microbiota intestinal. Se encontró una diversidad de especies más baja en las aves del grupo con contaminación lumínica, lo que sugiere que esta puede causar una gran pérdida de especies, perjudicial para los hospedadores debido a la posible pérdida de funciones esenciales, como la asimilación de nutrientes.

En el artículo de Wei *et al.* (2020) se ha demostrado que la exposición constante a la luz puede afectar a la microbiota intestinal y los productos metabólicos en ratas, así como deteriorar la función de barrera intestinal y el eje intestino-hígado.

Liebert *et al.* (2019), describe efectos en la microbiota por la luz visible o infrarroja en ratones de una manera beneficiosa. Un estudio de Kim *et al.* (2019), también aporta datos a que la exposición de ratones a condiciones de luz alteradas influye en la composición de la microbiota. Para este estudio se analizaron ciclos de luz continua, oscuridad continua y un régimen estándar de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

El objetivo general de este estudio es analizar la microbiota intestinal de *Tenebrio molitor* en diferentes condiciones de luz y con dos dietas distintas.

Los objetivos específicos del trabajo son:

– Comparar el efecto en la microbiota de las larvas al someter a diferentes condiciones de luz: luz continua, fotoperiodo, oscuridad y luz roja, a lo largo del periodo de tratamiento.

– Comparar las diferencias en la microbiota entre dos dietas: una compuesta por brócoli y una base de avena, y otra de posos de café y una base de avena.

– Analizar el efecto de la luz y la dieta en la composición de la microbiota de *T. molitor*.

En base a estudios previos y los objetivos planteados, las hipótesis propuestas son:

– Diferentes condiciones de luz durante un periodo de tiempo modifican la microbiota de *T. molitor*.

– Distintas dietas varían la microbiota de las larvas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseño experimental

Se recolectaron larvas de *T. molitor* del cultivo perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, en conjunto con ArthropoTech S.L.

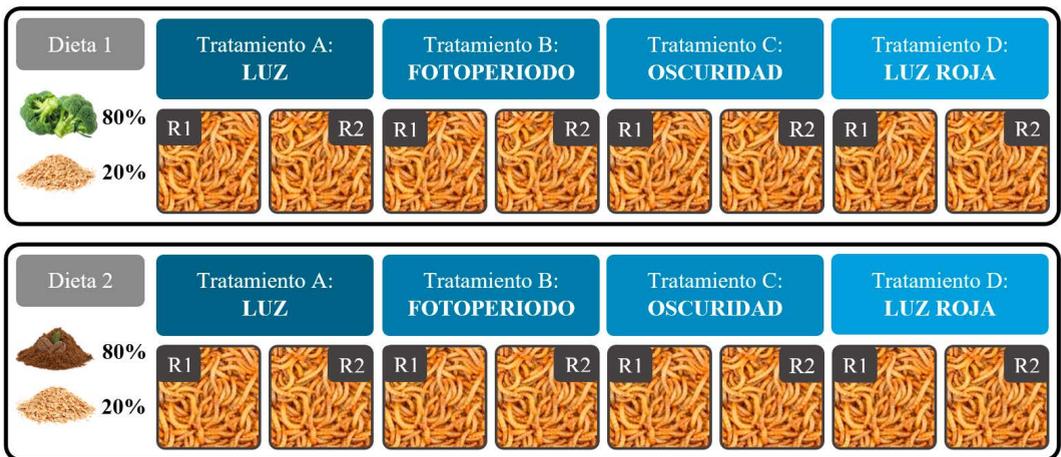
Los individuos recolectados debían de situarse en una fase temprana del desarrollo larvario para evitar que durante el periodo de tratamiento lleguen a pupar. Por tanto, se decidieron utilizar 15 larvas por cada tratamiento y dieta, para asegurar que al final del periodo de experimentación hubiera al menos 5 larvas aptas para su análisis.

Se empleó una caja de plástico especial para insectos con una tapa de rejilla, que contaba con unas dimensiones de 21x21x6 cm en el que se ubicaron las diferentes larvas.

Para cada tratamiento de luz y dieta se realizaron dos réplicas, por tanto, se recolectaron en torno a 240 larvas de *T. molitor*, que fueron distribuidas en las 16 cajas donde se realizó el experimento.

El sustrato que se utilizó para la dieta 1 estaba basado en un 80% de brócoli y 20% de avena, y el sustrato de la dieta 2 era un 80% posos de café y 20% de avena.

Tanto el brócoli como los posos de café estaban húmedos, por lo que se secaron en una estufa previamente para evitar el crecimiento de mohos durante el periodo de tratamiento. Además, el brócoli y la avena se trituraron para dejar toda la alimentación en polvo y que



**Figura 2.** Esquema del diseño experimental: dos dietas y cuatro tratamientos con diferentes condiciones de luz y sus réplicas (R1 y R2).



**Figura 3.** Tratamiento de luz continua. **Figura 4.** Tratamiento de fotoperiodo.



**Figura 5.** Tratamiento de oscuridad continua.



**Figura 6.** Tratamiento de luz roja continua.

sea más fácil su administración. Las larvas de ambas dietas tuvieron alimentación *ad libitum* durante todo el experimento.

Para el diseño experimental de los diferentes tratamientos de luz: luz continua, fotoperiodo, oscuridad continua y luz roja continua, y de las dos dietas, una basada principalmente en brócoli y otra en posos de café (Figura 2), se decide una duración de unos 14 días mínimo para obtener un cambio completo de la microbiota de las larvas por los diferentes tratamientos.

Una vez las larvas situadas en las cajas y alimentadas, pasaron a ubicarse en las diferentes zonas de experimentación. Para el tratamiento de luz continua se utilizaron bombillas de luz blanca que estarían encendidas durante todo el periodo de experimentación e incidiendo sobre las larvas (Figura 3). En el caso del fotoperiodo, las cajas con las larvas se situaron cerca de una ventana donde tendrían diferentes condiciones de luz (Figura 4), en función de las horas de luz solar y de oscuridad (que

por la época del año en el que se ha realizado, son en torno a unas 11 horas de luz y 13 horas de oscuridad). El tratamiento de oscuridad continua tuvo las cajas en completa ausencia de luz dentro de una caja de cartón recubierta con bolsas oscuras y opacas que impedían el paso de la luz (Figura 5). Para la luz roja, las larvas estuvieron sometidas a la incidencia de la luz roja procedente de una bombilla (Figura 6), que estaba encendida constantemente (a excepción de 30 minutos cada 12 horas para evitar un sobrecalentamiento).

El experimento comenzó el 18 de febrero de 2022 y finalizó el 7 de marzo de 2022, por lo que estuvieron unos 17 días alimentados y en tratamiento constante en unas condiciones de entorno a 20–25°C de temperatura y 50–60% de humedad. Durante este periodo fueron regularmente revisados para comprobar que no faltase comida, así como descartar de las cajas aquellas larvas que habían pupado. Al finalizar el experimento se comprobó que todas las larvas del tratamiento de fotoperiodo estaban muertas, no obstante, para el resto de tratamientos habían al menos 5 larvas vivas para su análisis.

## 2. Extracción y pretratamiento del intestino

Tras el periodo de tratamiento se pasó a la etapa de extracción del sistema digestivo de las larvas. Se utilizan materiales de disección tales como bisturí, pinzas de disección y tijeras Metzemaum previamente esterilizados en un mechero Bunsen.

Previamente, las larvas de *T. molitor* se sacrificaron por congelación a –20°C. Se comienza con la retirada del digestivo, mediante un estereomicroscopio (lupa binocular), realizando una incisión en la parte ventral. Posteriormente se identifica la porción digestiva (Figura 7) y con la pinza se retira cuidadosamente y se coloca en un tubo Eppendorf. Para el intestino de cada individuo se usa un tubo Eppendorf, por tanto, en total se usaron 60 tubos con los intestinos procedentes de los diferentes tratamientos (5 tubos para cada tratamiento y réplica con el intestino de una larva en cada uno). Estas muestras se conservaron a –20°C para evitar su desnaturalización.

Para realizar la extracción del ADN de los intestinos se utilizó el siguiente protocolo:



**Figura 7.** Imagen aumentada de una larva de *T. molitor* a la que se le ha extraído el intestino.

1. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de Insect Lysis Buffer y 20  $\mu\text{L}$  de Proteínasa K de Promega (10 mg/mL). Se cierra el tubo y se centrifuga.
2. Se incuba a 56°C durante mínimo 6 h en la estufa con el agitador para digerir el tejido.
3. Posteriormente, se centrifuga a 2000 rpm durante 15 s para quitar la condensación.
4. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de Binding Mix. Se vuelve a tapar, se agita enérgicamente de 10–15 segundos y se centrifuga a 11000 rpm durante 20 s para que la muestra quede abajo.
5. Se transfiere el líquido del Eppendorf al tubo con la columna. Se tapa y se centrifuga a 11000 rpm durante 5 minutos para que el ADN se pegue a la membrana.
6. Primer lavado: se añaden 200  $\mu\text{L}$  de Protein Wash Buffer, se tapa y centrifuga a 11000 rpm durante 2 minutos.
7. Segundo lavado: se añaden 600  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer, se tapa y centrifuga durante 5 minutos a 11000 rpm.
8. Se elimina el líquido recogido en el tubo y se vuelve a centrifugar 5 min a 11000 rpm.
9. Se pasa la columna a un nuevo tubo Eppendorf. Se añaden de 30–60  $\mu\text{L}$  de agua previamente calentada a 56°C directamente sobre la membrana de la columna. Se incuba a temperatura ambiente 1 minuto. Se tapa finalmente.
10. Se centrifuga a 11000 rpm durante 5 min. Se desecha la columna, se tapa y se congela.

### 3. Análisis de comunidades bacterianas

Tras la extracción del ADN del intestino en el laboratorio, los tubos Eppendorf con las muestras se llevaron al Servicio de Metagenómica LAIB para el análisis de la microbiota. Se realizaron *pools* de los 5 individuos de cada réplica y tratamiento para minimizar la variación individual.

Se utilizó “Ion 16S Metagenomics Kit” (Ion Torrent), para el análisis de comunidades bacterianas usando la amplificación de genes 16S RNA, que incluye los cebadores para amplificar las regiones variables 2, 4 y 8 en un solo 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 con una identidad del 100%.

Una vez recibidos los análisis, se utilizó el *software* Ion Reporter™ v5.18.2.0. Se creó un *workflow* específico para la determinación de diversidad en muestras de ARN 16S, con dos bases de datos (Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1 y Curated Greengenes v13.5), usando los *primers* que había por defecto y filtrando las lecturas por abundancia en 10 lecturas o más para que sean válidas. Además, se incluyen otros parámetros por defecto como el límite de la especie, en el que se usa un 99% o más como valor de identidad requerido para hacer una identificación de especie.

Tras esto, se realiza el análisis de cada *pool* con el *workflow* creado, obteniendo resultados que contienen datos de consenso (combinados de todos los cebadores) o datos desglosados por cebador, entre otra información como número de lecturas totales, lecturas válidas, lecturas ignoradas por tener un número de copias inferior a 10. Ion Reporter incluye cálculos de diversidad alfa y beta. Los resultados de la diversidad alfa describen la diversidad en una sola muestra a nivel de especie, género, y familia; y los resultados de la diversidad beta describen la diversidad entre múltiples muestras a nivel de especie, género y familia. En nuestro caso solo se ha estudiado la diversidad alfa.

Con este *software* se obtienen gráficos Krona de cada réplica, así como tablas de todas las identificaciones de la diversidad alfa conseguidas con las bases de datos.

### Resultados

Los resultados de la secuenciación obtenidos en el análisis para los diferentes tratamientos y dietas se muestran de forma detallada en las diferentes tablas incluidas en el *software*.

En todos los *pools* del estudio aparecen los filos Tenericutes, Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de luz continua con la dieta de 80% brócoli y 20% avena (Figura 8).

A nivel de filo, las dos réplicas presentan mayoritariamente bacterias Tenericutes (la primera réplica 53,59% y la segunda 42,13%), seguida de Firmicutes (15,69% y 43,93%), Proteobacteria (23,49% y 6,56%), y Cyanobacteria (7,13% y 4,8%). En menor proporción, aparecen otros filos como Bacteroidetes y Actinobacteria. Únicamente en la réplica 2 aparece un 0,06% de *Deinococcus-Thermus*.

A nivel de clase, en el filo Tenericutes destaca la clase Mollicutes, en Firmicutes aparece Bacilli, en el filo Proteobacteria predomina la clase Gammaproteobacteria, y en el filo Cyanobacteria destaca Nostocophycidae.

Más específicamente, resalta la familia Spiroplasmataceae del filo Tenericutes, y dentro de esta el género *Spiroplasma* (24,49% y 18,75%), el género *Enterococcus* y *Bacillus* del filo Firmicutes, y la familia Enterobacteriaceae del filo Proteobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de oscuridad continua con la dieta de 80% brócoli y 20% avena (Figura 9).

A nivel de filo, en el tratamiento de oscuridad predominan en ambas réplicas Firmicutes (44,01% y 37,85%), Tenericutes (15,19% y 43,35%), próximo a este filo se encuentra Proteobacteria (39,25% y 16,62%), y Cyanobacteria (1,51% y 2,13%). Minoritariamente se encuentran Actinobacteria y Bacteroidetes.

A nivel de clase, aparece Bacilli como predominante del filo Firmicutes, Mollicutes en el filo Tenericutes, Gammaproteobacteria en Proteobacteria, y en el filo Cyanobacteria destaca Nostocophycidae.

En estos *pools*, a nivel de género destaca *Bacillus* (36,62% y 37,04%) de la familia Bacillaceae del filo Firmicutes, el género *Spiroplasma* del filo Tenericutes y la familia Enterobacteriaceae del filo Proteobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de luz roja continua con la dieta de 80% brócoli y 20% avena (Figura 10).

A nivel de filo, en ambas réplicas destacan Tenericutes (37% y 60,14%), seguido de Firmicutes (20,37% y 25,72%), continuado por Proteobacteria (28,52% y 9,05%), y Cyanobacteria (8,35% y 3,45%). Minoritariamente se encuentran Actinobacteria y Bacteroidetes; y en la réplica 2 aparece residualmente el filo Synergistetes (0,04%).

A nivel de clase, en el filo Tenericutes destaca la clase Mollicutes, en Firmicutes aparece Bacilli, en el filo Proteobacteria predomina la clase Gammaproteobacteria, y en Cyanobacteria destaca Nostocophycidae.

Existe una abundancia del género *Spiroplasma* del filo Tenericutes (16,91% y 22,94%), el género *Bacillus* y la familia Streptococcaceae del filo Firmicutes, y la familia Enterobacteriaceae del filo Proteobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de luz continua con la dieta de 80% posos de café y 20% avena (Figura 11).

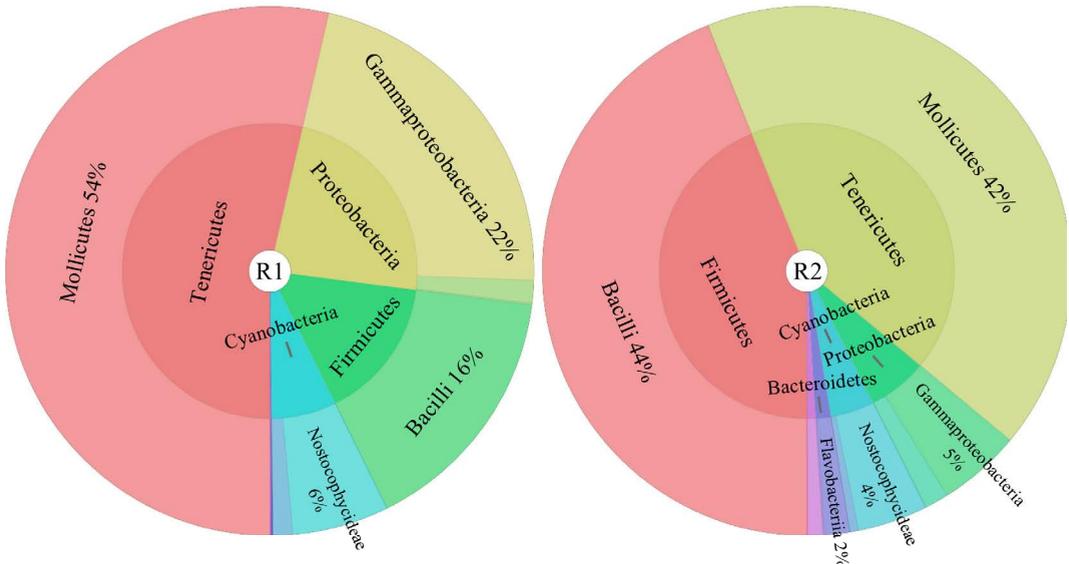
A nivel de filo, las réplicas de la dieta de posos de café dan lugar a una predominancia de Proteobacteria (53,48% y 73,48%), seguido de Tenericutes (36,38% y 9,26%), el filo Cyanobacteria (2,89% y 11,66%) y Firmicutes (6,96% y 5,21%). En menor abundancia, Actinobacteria y Bacteroidetes.

A nivel de clase, Gammaproteobacteria es la principal del filo Proteobacteria, Mollicutes del filo Tenericutes, la clase Nostocophycidae del filo Cyanobacteria y Bacilli en el filo Firmicutes.

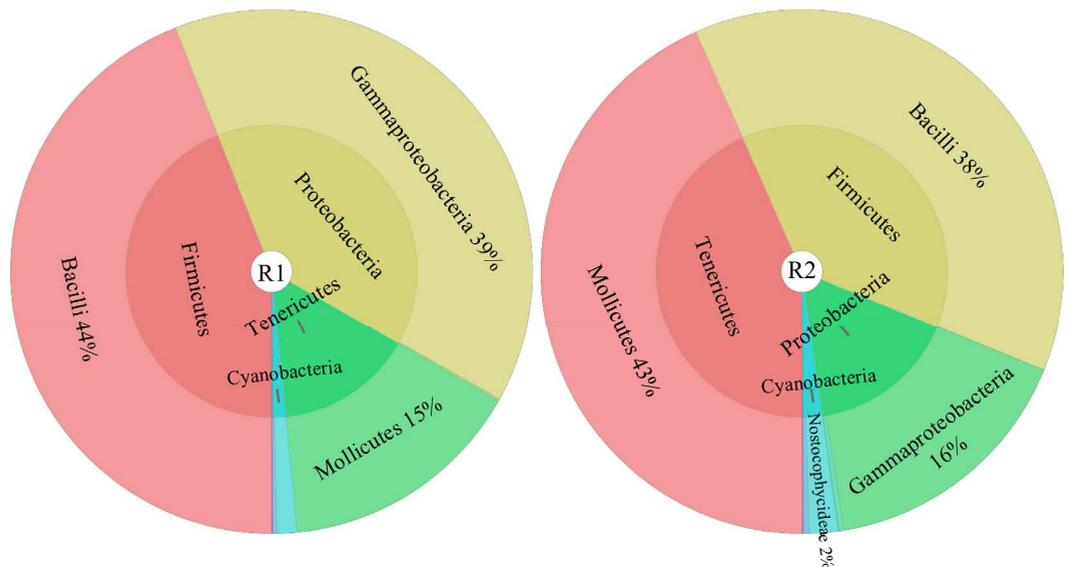
La familia Enterobacteriaceae (15,94% y 29,5%) y el género *Pseudomonas* (15,03% y 15,5%) son los más abundantes de Proteobacteria, también es importante el porcentaje del género *Spiroplasma* de Tenericutes, y la familia Nostocaceae de Cyanobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de oscuridad continua con la dieta de 80% posos de café y 20% avena (Figura 12).

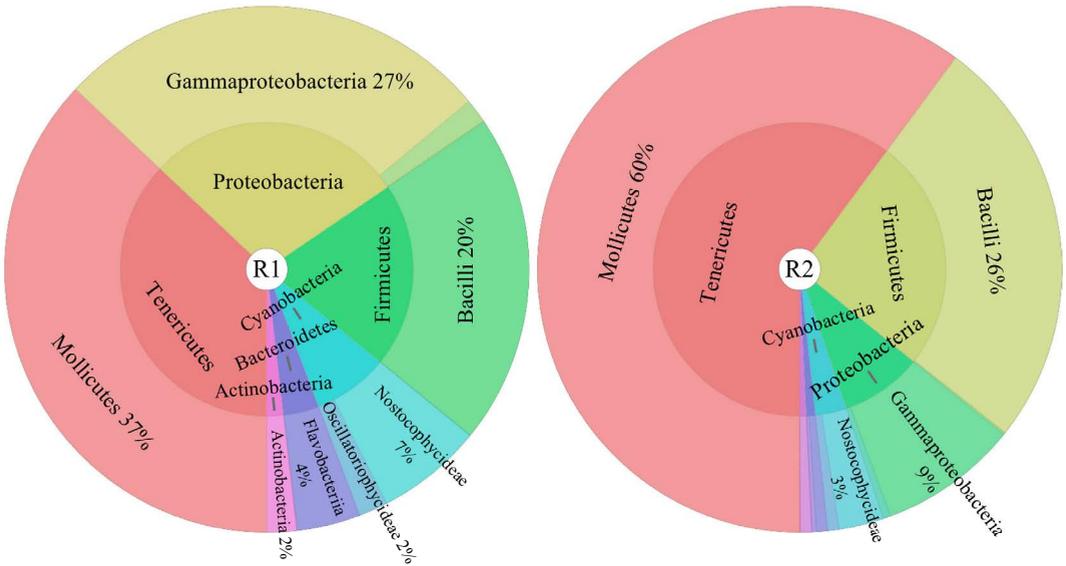
A nivel de filo, destacan Proteobacteria (67,8% y 55,1%), continuado por Tenericutes



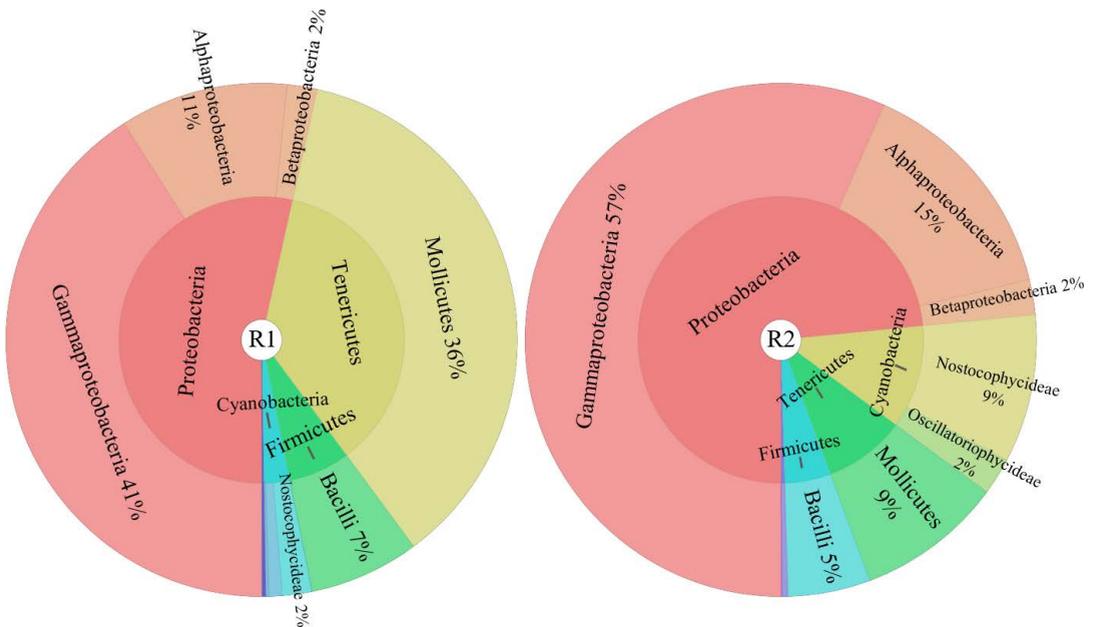
**Figura 8.** Gráficos Krona del tratamiento de luz continua con la dieta de 80% de brócoli.



**Figura 9.** Gráficos Krona del tratamiento de oscuridad con la dieta de 80% de brócoli.



**Figura 10.** Gráficos Krona del tratamiento de luz roja con la dieta de 80% de brócoli.



**Figura 11.** Gráficos Krona del tratamiento de luz continua con la dieta de 80% de posos de café.

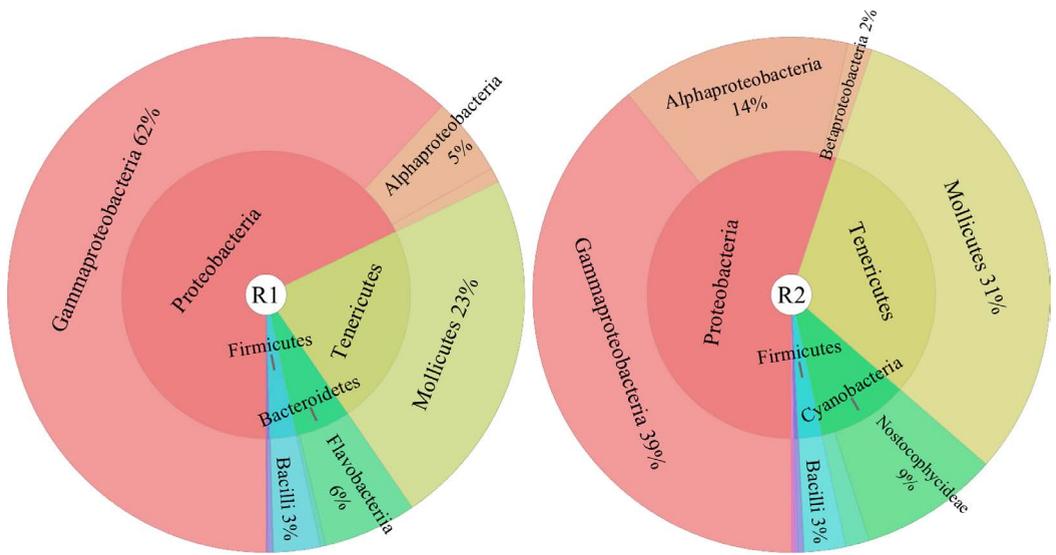


Figura 12. Gráficos Krona del tratamiento de oscuridad con la dieta de 80% de posos de café.

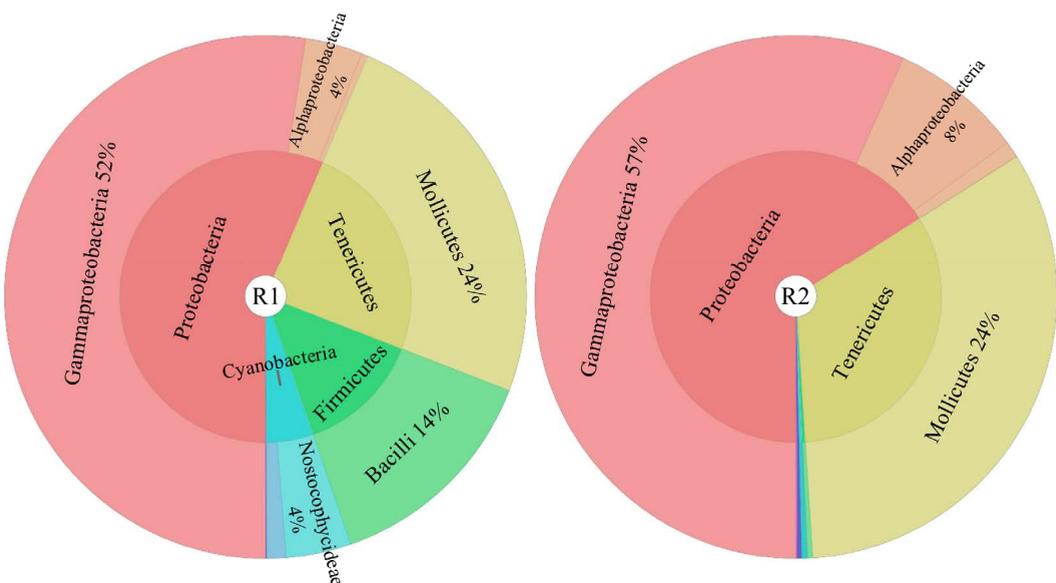


Figura 13. Gráficos Krona del tratamiento de luz roja con la dieta de 80% de posos de café.

(22,67% y 31,37%), Cyanobacteria (0,35% y 10,18%) y el filo Firmicutes (2,97% y 2,61%). En menor abundancia, Actinobacteria y Bacteroidetes. Cabe mencionar la aparición del filo Spirochaetes en la réplica 1 con un 0,02% de abundancia relativa.

A nivel de clase, en Proteobacteria predomina Gammaproteobacteria, en Tenericutes aparece Mollicutes, la clase Nostocophycidae de Cyanobacteria y Bacilli en Firmicutes.

Específicamente del filo Proteobacteria, es importante la familia Enterobacteriaceae (55,05% y 17,43%), el género *Pseudomonas* e incluso se ha detectado en la réplica 1 un gran porcentaje de la especie *Klebsiella oxytoca*; del filo Tenericutes destaca el género *Spiroplasma*; y la familia Nostocaceae del filo Cyanobacteria.

– *Pools* correspondientes a las réplicas del tratamiento de luz roja continua con la dieta de 80% posos de café y 20% avena (Figura 13).

A nivel de filo, la mayoría son Proteobacteria (56,4% y 65,97%), Tenericutes (24,45% y 32,98%), el filo Firmicutes (13,87% y 0,33%) y Cyanobacteria (5,21% y 0,36%). Minoritariamente, Actinobacteria y Bacteroidetes.

A nivel de clase, en Proteobacteria destaca Gammaproteobacteria, en Tenericutes aparece Mollicutes, Bacilli en Firmicutes y la clase Nostocophycidae de Cyanobacteria.

La familia Enterobacteriaceae (45,07% y 34,05%) es la más destacable del filo Proteobacteria, seguida del género *Pseudomonas*; *Spiroplasma* es el género predominante en Tenericutes; y la familia Nostocaceae de Cyanobacteria.

## DISCUSIÓN

La microbiota intestinal de los insectos suele representar una comunidad muy simple. Los insectos suelen depender de las bacterias intestinales para realizar funciones biológicas básicas (Jung *et al.*, 2014). Sin embargo para muchas especies la relación entre el insecto y su microbiota sigue sin estar definida (Dillon y Dillon, 2004).

La justificación del presente estudio se basa en analizar la microbiota intestinal de *Tenebrio molitor* y compararla para varios tratamientos en los que se apliquen diferentes condiciones de luz, y a la vez con dos dietas distintas.

*T. molitor* es un insecto que presenta fototaxis negativa, y por tanto prefiere entornos oscuros. No se han encontrado estudios en los que se analice la microbiota de insectos a los que se han expuesto a diferentes condiciones de luz, y es interesante saber si estos cambios podrían afectar a la composición microbiana, y de esta forma, ver cuáles son las condiciones óptimas de luz en la cría de insectos industrial, mejorando el rendimiento tanto del insecto, energético y económico.

En cuanto a la dieta, se ha decidido utilizar subproductos de la industria alimentaria para comprobar el grado de reutilización que podrían tener en este sector.

*T. molitor* es omnívoro en su forma larvaria, lo que significa que pueden obtener sus nutrientes tanto de material vegetal como de productos animales (Anastasia Hicks, 2017). Residuos orgánicos y subproductos alimentarios pueden utilizarse como alimentos, ya que la eficiencia de conversión de los insectos es bastante alta (más de cinco veces la de la carne de vacuno) (Ravzanaadii *et al.*, 2012). Además, *T. molitor* tiene la capacidad de transformar productos de desecho poco nutritivos en una dieta rica en proteínas, energía y grasas (Ramos–Elorduy *et al.*, 2002; Nito Loreto, 2019).

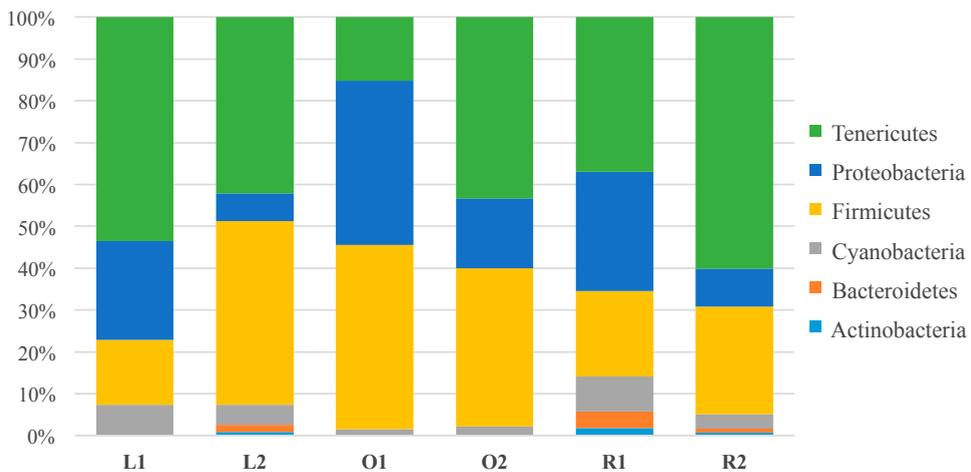
Tanto los posos de café (45% carbohidratos y 14% proteínas, aproximadamente), como el brócoli seco (alrededor de 20% carbohidratos y 22% proteínas) son subproductos que podrían ser idóneos para alimentar las larvas de *T. molitor* por su composición nutricional (Campos–Vega *et al.*, 2015; dos Reis *et al.*, 2015), además de que no se han encontrado estudios que los utilicen como dieta.

Tras el periodo de experimentación de este estudio, con los diferentes tratamientos de luz (luz continua, fotoperiodo, oscuridad continua y luz roja continua) y con dos dietas (una con

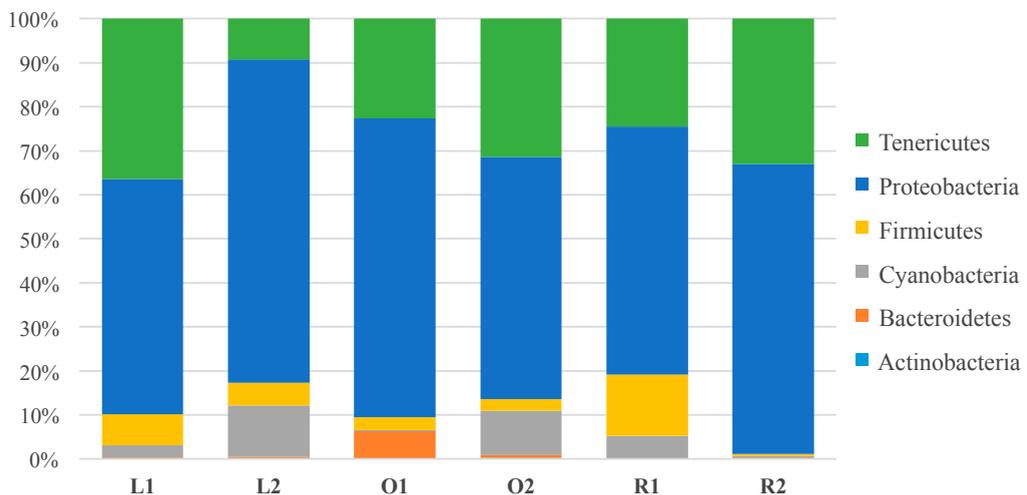
un 80% de brócoli seco y 20% de avena, y otra con 80% de posos de café y 20% de avena), se pudieron obtener al menos 5 individuos de cada para crear un *pool* que se analizó, a excepción del tratamiento de fotoperiodo. Esto es debido a que las larvas, durante las horas de luz, estuvieron expuestas a los rayos directos del sol a través de la ventana, lo cual pudo

hacer que no sobrevivieran a esas condiciones extremas.

Una vez obtenidos los resultados de los análisis, su estudio determinó que en todos los tratamientos predominan Tenericutes, Proteobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria; y en menor proporción, Bacteroidetes y Actinobacteria. Aunque en determinados *pools* aparecen



**Figura 14.** Porcentaje de filos de la dieta de 80% brócoli y 20% avena y los tratamientos de luz continua (réplicas L1 y L2), oscuridad (O1 y O2) y luz roja (R1 y R2).



**Figura 15.** Porcentaje de filos de la dieta de 80% posos de café y 20% avena y los tratamientos de luz continua (réplicas L1 y L2), oscuridad (O1 y O2) y luz roja (R1 y R2).

filos específicos, pero en muy baja proporción, se podría considerar que son casos aislados debido a su baja abundancia (inferior a 0,06%) por posible contaminación, que podría haberse producido durante la extracción del intestino. Los taxones bacterianos encontrados son similares a los descritos por Garofalo *et al.* (2017), donde los tres filos dominantes eran Tenericutes, Proteobacteria y Firmicutes, encontrándose también Fusobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria con poca abundancia. También se asemejan a los resultados de Stoops *et al.* (2016), donde destacan Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Streptophyta.

A la hora de analizar los datos, se observa de forma genérica, que en las réplicas de un mismo tratamiento existe cierta variabilidad en los porcentajes de abundancia de filos, y por tanto, de los microorganismos. Esta diversidad se relaciona con la variabilidad individual de estructuras especializadas del intestino y el efecto del pH, las condiciones redox, su metabolismo y el tipo de alimento ingerido (Anastasia Hicks, 2017). Estas propiedades pueden diferir a lo largo del intestino, dando lugar a patrones de colonización distintivos (Schmidt y Engel, 2021).

Comparando los tratamientos de cada dieta, no se aprecia una diferencia observable entre la luz continua, oscuridad y luz roja. No obstante, sí se aprecia una clara diferencia entre el porcentaje de abundancia de filos en los tratamientos de la dieta de brócoli (Figura 14) y el porcentaje de filos en los de la dieta de posos de café (Figura 15).

En la dieta de brócoli, existe una predominancia de los filos Tenericutes (color verde en los gráficos) y Firmicutes (amarillo), mientras que en la dieta de posos de café, abunda mayoritariamente Proteobacteria (color azul).

En la dieta de brócoli, la media de bacterias del filo Tenericutes es de 41,9%, la de Firmicutes 31,3% y de Proteobacteria 20,6%. En cuanto a género, destaca principalmente *Spiroplasma* con una media del 18,2%.

Jung *et al.* (2014), analizaron la comunidad bacteriana de una muestra alimentada con tierra y salvado 1:1 y estaba formada por Tenericutes (36,6%), Proteobacteria (34,1%) y Firmicutes (26,2%), similar a la obtenida por la dieta de brócoli de este estudio. En cuanto a los géneros, *Spiroplasma* (38,7%) fue el más predominante.

En la dieta de posos de café, la media de bacterias del filo Proteobacteria es de 62%, la de Tenericutes 26,2% y Firmicutes 5,3%. La familia principal es Enterobacteriaceae, con un 32,8% de media, entre los que se encuentran especies como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Salmonella*, *Morganella*...

Vandeweyer *et al.* (2017) encontraron un contenido microbiano similar a la dieta de posos de café de este estudio, con una abundancia relativa de Proteobacteria (57%) y Tenericutes (23%), además de dominar especies de *Spiroplasma* y *Erwinia*.

Para futuros estudios sería interesante ver si existe alguna combinación de subproductos de la industria alimentaria que sea óptima para el crecimiento de las larvas destinadas a cría industrial, así como el consumo de oxígeno, la producción de CO<sub>2</sub> y la generación de calor. Esta información ayudará a diseñar un sistema óptimo de producción a gran escala.

Uno de los problemas de la cría de insectos es que son animales ectotermos (Resh y Cardé, 2009), por lo que el control de la temperatura es importante para optimizar la cría comercial de *T. molitor*. Asimismo, el contenido óptimo de agua de los alimentos empleados para la cría puede aumentar la densidad y la eficiencia de una de granja de cría (Deruytter *et al.*, 2020).

También hay que tener en cuenta la presencia de cepas patógenas dentro de la microbiota de *T. molitor*, como es el caso del género *Salmonella* (del cual se han encontrado en este estudio), para que sea considerado un alimento seguro para los humanos. Deberían establecerse tratamientos físicos y/o químicos para asegurar un producto seguro, así como unas buenas prácticas de higiene para disminuir riesgos de

contaminación. Además, el secado y la trituración de las larvas las reduciría y mejoraría su comerciabilidad (Ghaly y Alkoaik, 2009).

Consideraciones finales: el tratamiento de fotoperiodo con la luz solar no es el más indicado porque los rayos directos sobre las larvas pueden ser mortales. Por lo que se considera que la oscuridad es la condición lumínica más idónea económicamente, además de que este insecto prefiere los entornos oscuros para su desarrollo.

## CONCLUSIONES

1. En el análisis de la microbiota intestinal de *Tenebrio molitor* se ha determinado que predominan los filos Tenericutes, Proteobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria; y en menor proporción, Bacteroidetes y Actinobacteria.

2. No se han observado cambios en los taxones microbianos de *T. molitor* cuando se aplican diferentes condiciones de luz (luz continua, oscuridad continua y luz roja).

3. La microbiota intestinal de *T. molitor* varía con la alimentación. Se han apreciado diferencias entre el contenido microbiano de la dieta basada en un 80% de brócoli y en la de 80% de posos de café. En la de brócoli predominan Tenericutes y Firmicutes, y en la de posos de café son mayoritarias bacterias del filo Proteobacteria.

## 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-2017-5964-2 del Ministerio de Ciencia Investigación y Universidades.

## Referencias

- Aguilar-Miranda, E., López, M., Escamilla-Santana, C., y Barba de la Rosa, A. (2001). Characteristics of Maize Flour Tortilla Supplemented with Ground *Tenebrio molitor* Larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 192–195. <https://doi.org/10.1021/jf010691y>
- Anastasia Hicks, K. (2017). Population Assay of *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae): Growth and Development Analysis. *Instars: A Journal of Student Research*, 3.
- Baek, S., Perez, A., Turcotte, R., White, J., Adedipe, F., y Park, Y. (2015). Response of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults to potato: Implications for monitoring and sampling. *Journal of Stored Products Research*, 60, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.11.002>
- Balfour, C., y Carmichael, L. (1928). The Light Reactions of the Meal Worm (*Tenebrio molitor* Linn). *The American Journal of Psychology*, 40(4), 576–584. <https://doi.org/10.2307/1414336>
- Ben Guerrero, E. (2018). Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H., y Oomah, B. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.012>
- Deruytter, D., Coudron, C., y Claeys, J. (2020). The influence of wet feed distribution on the density, growth rate and growth variability of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(2), 141–149. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.0049>
- Dillon, R., y Dillon, V. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- dos Reis, L., de Oliveira, V., Hagen, M., Jablonski, A., Flôres, S., y de Oliveira Rios,

- A. (2015). Effect of cooking on the concentration of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. *Avenger*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Alphina F1*) grown in an organic system. *Food Chemistry*, 172, 770–777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.124>
- Engel, P., y Moran, N. (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>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Tacconi, M., Cardinali, F., y Aquilanti, L. *et al.* (2017). The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology*, 62, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.012>
- Ghaly, A., y Alkoaik, F. (2009). The Yellow Mealworm as a Novel Source of Protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 319–331. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2009.319.331>
- Grau, T., Vilcinskis, A., y Joop, G. (2017). Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 72(9–10), 337–349. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0033>
- Gupta, A., y Nair, S. (2020). Dynamics of Insect–Microbiome Interaction Influence Host and Microbial Symbiont. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357>
- Jiang, J., He, Y., Kou, H., Ju, Z., Gao, X., y Zhao, H. (2020). The effects of artificial light at night on Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*): Behavioral rhythm disruption, melatonin suppression and intestinal microbiota alterations. *Ecological Indicators*, 108, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105702>
- Jung, J., Heo, A., Park, Y., Kim, Y., Koh, H., y 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>
- Kim, Y., Snijders, A., Brislawn, C., Stratton, K., Zink, E., y Fansler, S. *et al.* (2019). Light–Stress Influences the Composition of the Murine Gut Microbiome, Memory Function, and Plasma Metabolome. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00108>
- Liebert, A., Bicknell, B., Johnstone, D., Gordon, L., Kiat, H., y Hamblin, M. (2019). “Photobionics”: Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome? *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(11), 681–693. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4628>
- Mendoza Lainez, E. (2017). Influencia de diferentes dietas en la composición nutricional del insecto comestible *Tenebrio molitor* y estudio de su pardeamiento. Universidad Pública de Navarra.
- Murray, D. (1968). The importance of water in the normal growth of larvae of *Tenebrio molitor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 11(2), 149–168. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1968.tb02041.x>
- Nino Loreto, D. (2019). Larval performance, morphological, behavioural and electrophysiological studies on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Università Politecnica delle Marche.
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Clementi, F., y Pasquini, M. *et al.* (2018). The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. *International Journal of Food Microbiology*, 272, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.001>
- Poveda Arias, J. (2019). Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. *Revista Digital Universitaria*, 20(1). <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a2>

- Rajagopal, R. (2009). Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 49(2), 114–119. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0023-z>
- Ramos–Elorduy, J., González, E., Hernández, A., y Pino, J. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to Recycle Organic Wastes and as Feed for Broiler Chickens. *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 214–220. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.214>
- Ravzanaadii, N., Kim, S., Choi, W., Hong, S., y Kim, N. (2012). Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 93–98. <https://doi.org/10.7852/ijie.2012.25.1.093>
- Resh, V. y Cardé, R. (2009). Encyclopedia of Insects (2ª edición). *Elsevier's Science & Technology*.
- Schmidt, K., y Engel, P. (2021). Mechanisms underlying gut microbiota–host interactions in insects. *Journal of Experimental Biology*, 224(2). <https://doi.org/10.1242/jeb.207696>
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K., Polak–Juszczak, L., Jarocki, A., y Jędras, M. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 4(6), 287–291. <https://doi.org/10.4236/as.2013.46041>
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., y Van Campenhout, L. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratoroides*) sold for human consumption. *Food Microbiology*, 53, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>
- Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., y Van Campenhout, L. (2017). Metagenetic analysis of the bacterial communities of edible insects from diverse production cycles at industrial rearing companies. *International Journal of Food Microbiology*, 261, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.018>
- Vargas Jerez, A., José Vivero, R., Uribe, S., Moreno, C. y Cadavid Restrepo, G. (2012). Interacción de microbiotas bacterianas e insectos. *Boletín del Museo Entomológico*, 4(3), 13–21.
- Wang, Y. y Zhang, Y. (2015). Investigation of Gut–Associated Bacteria in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Larvae Using Culture–Dependent and DGGE Methods. *Annals of the Entomological Society of America*, 108 (5), 941–949. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav079>
- Wei, L., Yue, F., Xing, L., Wu, S., Shi, Y., y Li, J. *et al.* (2020). Constant Light Exposure Alters Gut Microbiota and Promotes the Progression of Steatohepatitis in High Fat Diet Rats. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01975>
- Wynants, E., Crauwels, S., Lievens, B., Luca, S., Claes, J., y Borremans, A. *et al.* (2017). Effect of post–harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>