



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES  
RANCHOS GANADEROS DE MÉXICO Y EVALUACIÓN DE  
SU EFECTO SOBRE GARRAPATAS *Rhipicephalus*  
*microplus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y DESARROLLO RURAL

P R E S E N T A:

**M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**

CODIRECCIÓN DE TESIS:

Dr. GUADALUPE PEÑA CHORA  
Dr. RUBÉN HERNANDEZ ORTÍZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos octubre de 2022

AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES RANCHOS GANADEROS DE MÉXICO Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus*

Tesis realizada por **Edgar Castro Saines** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**

COMITÉ REVISOR

**Codirector de tesis:** Dr. Guadalupe Peña Chora

**Codirector de tesis:** Dr. Rubén Hernández Ortiz

**Revisor:** Dra. Mariana Pedernera Romano

**Revisor:** Dr. Fernando Iván Flores Pérez

**Revisor:** Dr. Virginio Aguirre Flores

**Revisor:** Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

**Revisor:** Dra. Eva Vianey Alquisira Ramírez

**Revisor:** Dra. Liliana Aguilar Marcelino

Cuernavaca, Morelos octubre de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca nacional número 811487 otorgada para la realización de estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias a través del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, por las facilidades permitidas para efectuar estudios de posgrado y el uso de instalaciones durante la ejecución de la etapa experimental.

A mis asesores Dr. Guadalupe Peña Chora y Dr. Rubén Hernández Ortiz por la orientación otorgada para el diseño y ejecución del presente trabajo.

Al comité revisor Dra. Mariana Pedernera Romano, Dr. Fernando Iván Flores Pérez, Dr. Virginio Aguirre Flores, Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, Dra. Eva Vianey Alquisira Ramírez y Dra. Liliana Aguilar Marcelino por sus enseñanzas durante el proceso de formación y los comentarios realizados a este trabajo.

Al M. en C. Francisco Martínez Ibáñez del Servicio Nacional de Sanidad Animal, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, por su apoyo en campo para la colecta de material biológico.

## DEDICATORIAS

*A mis padres:*

*Donato Castro Estela*

*Cruz Elena Saines Díaz*

*Y a la vida, por permitir dar un paso más...*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras .....	viii
Índice de cuadros .....	x
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
Revisión de literatura .....	1
Generalidades de garrapatas .....	2
Importancia de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	2
Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
Métodos de control .....	4
Control ecológico .....	4
Control inmunológico .....	4
Control químico .....	4
Control biológico .....	5
Bacterias en suelos .....	5
Bacterias en garrapatas .....	5
Factores de virulencia asociados a bacterias .....	6
JUSTIFICACIÓN .....	7
HIPÓTESIS GENERAL .....	7
OBJETIVO GENERAL .....	8
OBJETIVOS PARTICULARES .....	8

REFERENCIAS .....	9
Capítulo 1. Aislamiento y selección <i>in vitro</i> de bacterias con efecto ixodicida a la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	14
RESUMEN .....	14
INTRODUCCIÓN .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Zonas de muestreo .....	15
Sitio de estudio .....	16
Aislamiento y cultivo de bacterias .....	16
Bioensayos .....	17
Cultivo de garrapatas .....	17
Prueba de Inmersión de Larvas .....	17
RESULTADOS .....	18
Zonas de muestreo .....	18
Aislamiento y selección de bacterias .....	18
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .....	18
REFERENCIAS .....	19
Capítulo 2. Identificación taxonómica de bacterias con efecto ixodicida a la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	22
RESUMEN .....	22
INTRODUCCIÓN .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Extracción de DNA y amplificación por PCR .....	24

Análisis filogenético .....	25
RESULTADOS .....	25
Amplificación de genes .....	25
Identificación de especie, muestra EC-35 .....	26
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN .....	31
REFERENCIAS.....	31
Capítulo 3. Caracterización de la patogenicidad y virulencia de la bacteria con efecto ixodicida hacia la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	34
RESUMEN.....	34
INTRODUCCIÓN.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
Cultivo de bacterias .....	36
Bioensayos.....	36
Cultivo de garrapatas.....	36
Prueba de Inmersión de Larvas.....	36
Prueba de Inmersión de Hembras Adultas .....	37
Prueba de Alimentación Capilar .....	38
Prueba de Inoculación en Celoma.....	38
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS .....	39
Prueba de Inmersión de Larvas .....	39
Prueba de Inmersión de Adultas .....	41

Prueba de Alimentación Capilar.....	43
Prueba de Inoculación en Celoma.....	44
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIÓN.....	49
REFERENCIAS.....	50
Capítulo 4. Análisis de la histoarquitectura de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> afectadas por la bacteria patógena .....	55
RESUMEN.....	55
INTRODUCCIÓN.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Cultivo de garrapatas .....	57
Diseño experimental .....	57
Procesamiento de tejido .....	58
Fijación .....	58
Deshidratación y aclaramiento .....	58
Microtomía .....	58
Tinción hematoxilina – eosina .....	59
Análisis estadístico.....	59
RESULTADOS.....	59
Análisis de larvas.....	59
Análisis de hembras adultas .....	62
DISCUSIÓN .....	63
CONCLUSIÓN.....	66

REFERENCIAS .....	66
Capítulo 5. Identificación de quitinasas en la bacteria patógena a la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	68
RESUMEN .....	68
INTRODUCCIÓN .....	68
MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
Cepa de bacteria y extracción de DNA .....	69
Diseño de oligonucleótidos .....	69
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	70
RESULTADOS .....	71
DISCUSIÓN .....	72
CONCLUSIÓN .....	73
REFERENCIAS .....	73
Capítulo 6. Evaluación <i>in vitro</i> de la toxicidad de la cepa EC-35 hacia el nematodo de vida libre <i>Panagrellus redivivus</i> .....	76
RESUMEN .....	76
INTRODUCCIÓN .....	77
MATERIALES Y MÉTODOS .....	78
Cultivo de nematodos .....	78
Cultivo de bacterias .....	78
Colecta de nematodos .....	78
Bioensayo .....	79
Análisis estadístico .....	79

RESULTADOS .....	79
DISCUSIÓN .....	80
CONCLUSIÓN .....	81
REFERENCIAS .....	81
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIÓN .....	83
REFERENCIAS .....	84
ANEXOS.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
<b>Figura 2.1.</b> Imagen de los productos de amplificación por PCR de los genes 16S rRNA (A) y rpoB (B) de la muestra de bacterias EC-35. M = Marcador molecular de ácidos nucleicos.....	26
<b>Figura 2.2.</b> Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen 16S rRNA de 21 especies de bacterias del género <i>Serratia</i> ; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.....	27
<b>Figura 2.3.</b> Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen rpoB de la cepa EC-35 con 17 especies de bacterias del género <i>Serratia</i> ; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.....	28
<b>Figura 2.4.</b> Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen 16S rRNA de la cepa EC-35 con diferentes cepas de diferentes especies de bacterias del género <i>Serratia</i> ; se muestra el número de acceso de las	

secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.....	29
<b>Figura 2.5.</b> Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen rpoB de la cepa EC-35 con diferentes cepas de diferentes especies de bacterias del género <i>Serratia</i> ; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.....	30
<b>Figura 3.1.</b> Mortalidad de larvas de garrapata <i>R. microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35. Las barras indican el porcentaje de mortalidad promedio $\pm$ error estándar, diferente literal indica diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ).....	40
<b>Figura 3.2.</b> Valores del análisis Probit de larvas de garrapatas <i>R. microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35.....	41
<b>Figura 4.1.</b> Cortes histológicos de larvas completas de garrapatas <i>R. microplus</i> teñidos con hematoxilina – eosina. x100. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós c) EC-35. Las flechas señalan el exoesqueleto. Barra 100 $\mu\text{m}$ .....	60
<b>Figura 4.2.</b> Zona caudal del exoesqueleto de larvas de garrapatas <i>R. microplus</i> teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós, c) EC-35. Las flechas señalan una de las zonas medidas. Barra 10 $\mu\text{m}$ .....	61
<b>Figura 4.3.</b> Efecto de dos ixodicidas sobre el exoesqueleto de larvas de garrapatas <i>R. microplus</i> , las barras indican el grosor promedio del exoesqueleto $\pm$ error estándar, coeficiente de variación 35.9%, diferente literal indica diferencia significativa; Tukey ( $p < 0.05$ ) .....	61

<b>Figura 4.4.</b> Islas de células nucleadas alrededor del estómago de larvas de garrapatas <i>R. microplus</i> teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós, c) EC-35.....	62
<b>Figura 4.5.</b> Exoesqueleto de garrapatas adultas <i>R. microplus</i> teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós c) EC-35. Las flechas señalan una de las zonas medidas. Barra 20 µm .....	62
<b>Figura 4.6.</b> Núcleos en canal de hemolinfa de garrapatas adultas <i>R. microplus</i> teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós c) EC-35 .....	63
<b>Figura 5.1.</b> Imagen de los productos de amplificación por PCR de los genes ChiA, ChiB y ChiC de la cepa de bacterias EC-35. M = Marcador de tamaño molecular de ácidos nucleicos .....	71
<b>Figura 6.1.</b> Mortalidad del nematodo <i>P. redivivus</i> expuesto a diferentes concentraciones de proteína total de la cepa de bacterias EC-35. Las barras indican el porcentaje de mortalidad promedio ± error estándar, diferente literal indica diferencias significativas, Tukey (p<0.05).....	80

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 3.1.</b> Tiempo de respuesta sobre la mortalidad de larvas de garrapatas <i>R. microplus</i> . Porcentaje de mortalidad en días posterior al desafío con 20 µg/mL de proteína total de la bacteria EC-35. Se muestra el promedio ± el error estándar.....	39
<b>Cuadro 3.2.</b> Promedios (± EE; n = 3) de los parámetros reproductivos por grupo de garrapatas <i>R. microplus</i> hembras adultas repletas desafiadas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35.....	42

<b>Cuadro 3.3.</b> Promedios ( $\pm$ EE; n = 3) evaluación del efecto de diferentes concentraciones de proteína total de la bacteria EC-35 sobre los parámetros reproductivos en grupo de garrapatas <i>R. microplus</i> hembras adultas repletas.....	42
<b>Cuadro 3.4.</b> Promedios ( $\pm$ EE; n = 10) de los parámetros reproductivos de hembras adultas <i>Rhipicephalus microplus</i> semi repletas alimentadas de forma artificial.....	43
<b>Cuadro 3.5.</b> Promedios ( $\pm$ EE; n = 10) evaluación del efecto de la proteína de la cepa EC-35 sobre los parámetros reproductivos de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> alimentadas artificialmente.....	44
<b>Cuadro 3.6.</b> Promedios ( $\pm$ EE; n = 10) de los parámetros reproductivos de hembras adultas repletas <i>R. microplus</i> inoculadas en el celoma con 0.05 $\mu$ g de proteína de la cepa EC-35.....	44
<b>Cuadro 3.7.</b> Promedio ( $\pm$ EE; n = 10) evaluación del efecto de la proteína de la cepa EC-35 en los parámetros reproductivos individuales de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> inoculadas en el celoma.....	45
<b>Cuadro 4.1.</b> Promedio ( $\pm$ EE; n = 10) Comparación del efecto de dos ixodicidas sobre la morfología de larvas de garrapata <i>R. microplus</i> .....	60
<b>Cuadro 5.1.</b> Números de acceso de genes reportados que codifican para quitinasa.....	70
<b>Cuadro 5.2.</b> Diseño de oligonucleótidos.....	70

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES RANCHOS GANADEROS  
DE MÉXICO Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE GARRAPATAS  
*Rhipicephalus microplus***

**RESUMEN**

El uso indiscriminado de ixodicidas químicos para controlar garrapatas, ha generado la aparición de poblaciones resistentes a su efecto letal. Bacterias patógenas de los géneros *Serratia*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* con capacidad para infectar artrópodos, han sido propuestas como una alternativa al uso de productos químicos empleados para el control de garrapatas. La búsqueda de bacterias como agentes de control biológico contra garrapatas representar una alternativa a seguir; por lo que el objetivo de este trabajo fue: aislar bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluar su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*. Para ello se aisló, seleccionó, identificó y caracterizó la patogenicidad de una muestra de bacterias con efecto ixodicida hacia la garrapata *R. microplus*; posteriormente se analizó la histoarquitectura de garrapatas afectadas por la bacteria patógena y derivado del daño observado, se decidió analizar la presencia de quitinasas en la bacteria. Finalmente se evaluó la toxicidad de la bacteria patógena hacia el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

A partir de una garrapata muerta se aisló y seleccionó una muestra de bacterias registrada con las siglas EC-35 la cual se identificó pertenecer a la especie *Serratia marcescens*. La bacteria causó la tasa de mortalidad más alta ( $52.27 \pm 1.37\%$ ) en larvas a la dosis de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína total de EC-35, obteniéndose una  $\text{CL}_{50}$  de 13.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En las garrapatas hembras adultas repletas desafiadas con EC-35 se evaluaron los porcentajes de mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje de control; al desafío por: 1) baño de inmersión, 2) alimentación capilar e 3) inoculación de bacterias en el celoma. En el baño de inmersión, el mayor porcentaje se alcanzó a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obteniéndose valores de 55.5, 50.9 y 52.5%; por alimentación capilar se obtuvieron valores de 90, 94.1 y 92.9%; y al inocular bacterias en el celoma a la concentración de 0.05  $\mu\text{g}$  los valores fueron de 90, 99.8 y 96.9% respectivamente. El análisis histológico de larvas afectadas por EC-35, mostró diferencias ( $p < 0.05$ ) en el promedio del grosor del exoesqueleto con  $6.01 \pm 0.6 \mu\text{m}$  para el grupo desafiado y  $17.06 \pm 2 \mu\text{m}$  en el grupo

testigo. Para el caso del exoesqueleto de las garrapatas hembras adultas no se observaron diferencias entre tratamientos. En ambos estadios larvas y garrapatas adultas, se observó una pérdida drástica de la histoarquitectura. Debido al daño en el exoesqueleto de las garrapatas afectadas por EC-35, se identificó en la bacteria mediante PCR y secuenciación la presencia de genes que codifican para las quitinasas A, B y C. También se evaluó la toxicidad de la cepa EC-35 hacia el nematodo de vida libre *P. redivivus*, donde los nematodos fueron expuestos a diferentes concentraciones de proteína total, sin embargo, no mostraron diferencias en la tasa de mortalidad con respecto al grupo testigo ( $p > 0.05$ ). Se concluye que se logró aislar, identificar y caracterizar una cepa de bacterias de la especie *S. marcescens* con presencia de quitinasas, no toxica hacia un agente de prueba, patógena a la garrapata *R. microplus*.

Palabras clave: garrapatas, bacterias, ixodicida, exoesqueleto.

### **ABSTRACT**

The indiscriminate use of chemicals ixodicidas to control ticks has generated the appearance of populations resistant to their lethal effect. Pathogenic bacteria of genus *Serratia*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* with capacity to infect arthropods have been proposed as an alternative to chemical products used for ticks. Bacteria as biological control agents against ticks represents an alternative to follow therefore, the objective of this work was: to isolate bacteria in different cattle ranches in Mexico and to evaluate their effect on *Rhipicephalus microplus* tick. For this purpose, the pathogenicity of a bacteria with an ixodicide effect on the *R. microplus* was isolated, selected, identified and characterized. Subsequently, the histoarchitecture of ticks affected by the pathogenic bacteria was analyzed and due to observed damage, it was decided to analyze the presence of chitinases in the bacteria. Finally, the toxicity of pathogenic bacteria towards the free-living nematode *Panagrellus redivivus* was evaluated.

A bacteria isolated and selected from a dead tick, it was registered with the acronym EC-35 and identified as member to the species *Serratia marcescens*. The bacteria caused the highest mortality rate ( $52.27 \pm 1.37\%$ ) in larvae with a dose of 40  $\mu\text{g/mL}$  of total protein of EC-35, obtaining an  $\text{LC}_{50}$  of 13.89  $\mu\text{g/mL}$ . The engorged adult female ticks challenged with EC-35, the percentages of mortality, inhibition of

oviposition and percentage of control were evaluated; to the challenge by: 1) immersion bath, 2) capillary feeding and 3) inoculation of bacteria in coelom. In the immersion bath, the highest percentage was reached at a concentration of 10 µg/mL, obtaining values of 55.5, 50.9 and 52.5%; by capillary feeding values of 90, 94.1 and 92.9% were obtained; and by inoculating bacteria in the coelom at a concentration of 0.05 µg, the values were 90, 99.8 and 96.9%, respectively. Histological analysis of larvae affected by EC-35 showed differences ( $p < 0.05$ ) in the average thickness of the integument with  $6.01 \pm 0.6 \mu\text{m}$  for the challenged group and  $17.06 \pm 2 \mu\text{m}$  for the control group. The integument of adult female ticks, no differences were showed between treatments. In both larval and adult tick instar, a drastic loss of histoarchitecture was observed. Due to the damage observed in the integument of ticks affected by EC-35, the genes encoding chitinases A, B and C was identified in the bacterium by PCR and sequencing. The toxicity of EC-35 strain towards the free-living nematode *Panagrellus redivivus* was evaluated. The nematodes exposed to different concentrations of total protein EC-35 did not show differences in the mortality rate with respect to the control group ( $p > 0.05$ ). In conclusion, it was possible to isolate, identify and characterize a strain of bacteria of the species *S. marcescens* with chitinases, non-toxic toward test agent, pathogenic to the *R. microplus* tick.

Key words: ticks, bacteria, ixodicide, integument

## REVISIÓN DE LITERATURA

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es un ectoparásito de bovinos y otros animales domésticos que, se distribuye mundialmente en el trópico; su importancia en la industria ganadera es debida a las pérdidas económicas que genera, causadas por la transmisión de hemoparásitos como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*. El método de control para *R. microplus* es aplicando garrapaticidas sintéticos, sin embargo, la aparición de poblaciones de garrapatas multiresistentes ha limitado su efectividad. En México se han reportado poblaciones de garrapata multiresistentes en los estados de Tabasco, Veracruz y Tamaulipas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

Una alternativa para controlar *R. microplus* podría ser mediante el uso de microorganismos como bacterias, las cuales secretan proteínas tóxicas y metabolitos secundarios hacia el ambiente extracelular lo cual contribuye a la virulencia de la bacteria. Los géneros de bacterias que podrían tener efecto acaropatógenos son del género: *Bacillus*, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Yersinia*. Sin embargo, a la fecha no existen productos comerciales a base de bacterias para controlar las infestaciones por *R. microplus* en el campo y, solamente existen algunos reportes de experimentos *in vitro* e *in vivo* con cepas de *Bacillus thuringiensis* (Lormendez *et al.* 2019).

Las bacterias del género *Serratia* son consideradas patógenos oportunistas las cuales se encuentran en diversos hábitats como agua, suelo, plantas, insectos y humanos. Su uso como agentes de biocontrol microbiano o el empleo de sus metabolitos secundarios, podría representar una alternativa a seguir en la búsqueda de nuevos métodos para el control de poblaciones de *R. microplus* (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008). Por lo que aislar, identificar, caracterizar la patogenicidad y evaluar su efecto en garrapatas; así como identificar factores de virulencia y evaluar su toxicidad hacia organismos no blanco son los pasos a seguir en la caracterización de muestras de bacterias potencialmente útiles como agentes de biocontrol.

## **Generalidades de garrapatas**

Las garrapatas son parásitos obligados que se alimentan de sangre, están consideradas entre los artrópodos vectores de mayor importancia que afectan a la industria ganadera, animales de compañía y humanos. A nivel mundial se reconocen 949 especies (Dantas-Torres, 2018) las cuales taxonómicamente se clasifican en cuatro familias: Deinocerotonidae, Nuttalliellidae Argasidae (garrapatas blandas) e Ixodidae (garrapatas duras) (Jongejan y Uilenberg 2004; Nava *et al.*, 2017). La familia Ixodidae es la más numerosa compuesta por 731 especies (Dantas-Torres 2018) divididas en 14 géneros, dentro del género *Rhipicephalus* se encuentra la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* (Guglielmone *et al.*, 2010).

La especie *R. microplus* es un ectoparásito de animales domésticos como bovinos y camellos, así como también de animales de vida silvestre como venados, su distribución es mundial entre las latitudes 32 °N y 35 °S, encontrándose en las principales zonas productoras de ganado de África, Centro y Sur América, Asia y Australia. La cantidad de sangre que ingieren las garrapatas puede afectar en la pérdida de peso y baja en la producción de leche en bovinos, pudiéndose encontrar cientos de ellas en un solo hospedero; al mismo tiempo es transmisora de los hemoprotozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, así como de la rickettsia *Anaplasma marginale* (Baker, 1999).

## **Importancia de la garrapata *Rhipicephalus microplus***

En México en el año 2013, las pérdidas económicas causadas por esta garrapata se calcularon en 573.61 millones de dólares anuales, las pérdidas de forma directa se debieron a baja en la producción de leche, reducción de peso en becerros, abortos y mortalidad; las pérdidas indirectas se asociaron con el costo de tratamientos de animales enfermos e infestados con garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). La exportación de ganado bovino en pie hacia los Estados Unidos a menudo se ve afectada por la presencia de garrapatas, lo que provoca que lotes de bovinos sean detenidos en las estaciones cuarentenarias de exportación ubicadas en la frontera México-Estados Unidos (González y Hernández, 2012).

## Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*

Se divide en dos, una fase de vida libre y una fase parásita

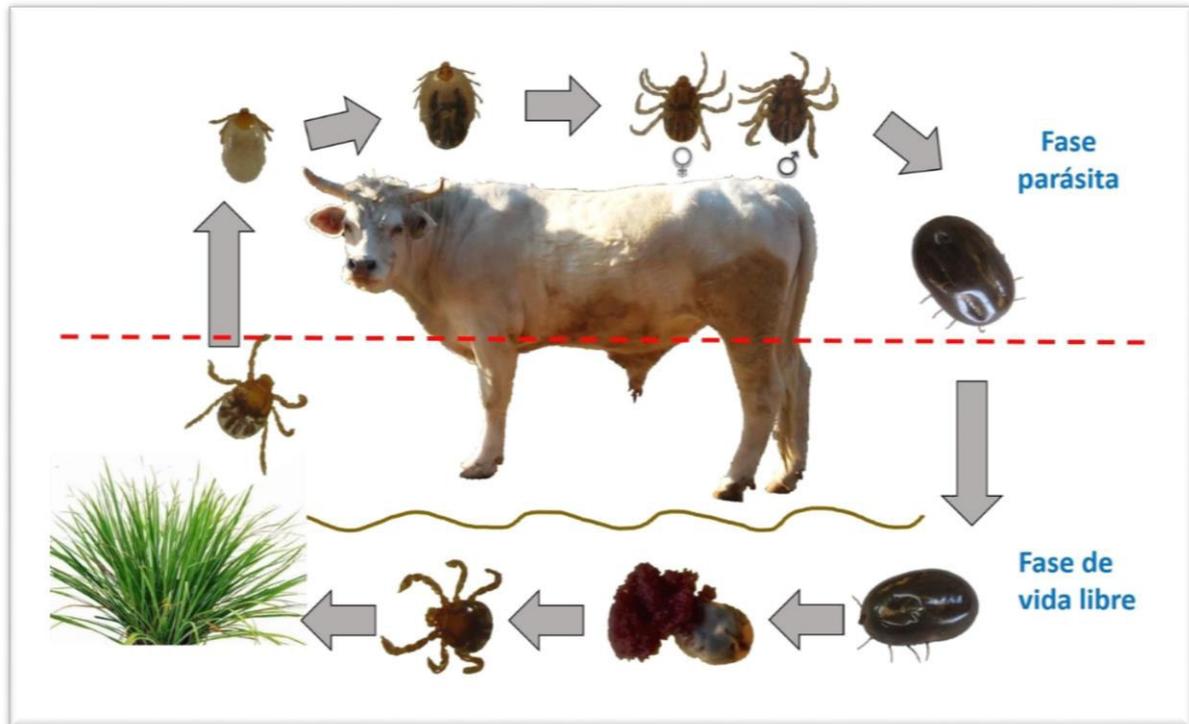


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*

Fase de vida libre. Los factores ambientales de humedad y temperatura influyen en la duración de este periodo. Cuando la garrapata hembra adulta se repleta de sangre, se desprende del bovino, cayendo al suelo donde busca un lugar con sombra para desovar, en condiciones ambientales de 27 °C y 80% de humedad relativa. La preoviposición dura 3 días y, la oviposición 14 días en los que desovan en promedio 3000 huevos color marrón y superficie brillante, después de la oviposición los huevos tardan 16 días en eclosionar. A la eclosión las larvas tienen tres pares de patas, las cuales trepan a las puntas de los pastos a la espera de un bovino, en esta fase la larva puede vivir hasta 108 días (Nuñez *et al.*, 1982).

Fase de vida parásita. (Periodo de 21 a 25 días) Cuando la larva trepa al bovino se fija en la piel, preferentemente en zonas de piel delgada y altamente vascularizadas como la entrepierna, zona perianal, cuello y borde anterior de las orejas donde comienza a alimentarse para el día 6 el 90% están repletas y en proceso de muda donde reciben el nombre de metalarva, entre el día 6-10 muda a ninfa la cual ya

posee cuatro pares de patas y se repleta aquí se le da el nombre de metaninfa o segunda muda, para el día 13 el 99% de las garrapatas están en esta etapa, donde en los últimos días el dimorfismo sexual es bien marcado. Las metaninfas mudan a adultos jóvenes, primero emergen los machos entre el día 13-14 estos se alimentan y comienzan a buscar hembras para fecundarlas, posteriormente emergen las hembras entre los días 14-15. Las primeras hembras semi-repletas se observan entre los días 17-18, la mayor cantidad de hembras repletas se desprenden el día 23 (Nuñez *et al.*, 1982).

### **Métodos de control**

Para el control de garrapatas se han descrito cuatro métodos principales los que abarcan el control ecológico, inmunológico, químico y biológico

#### **Control ecológico**

Con base en la modificación de las condiciones ambientales donde habita la garrapata en su fase de vida libre, mediante el establecimiento de pastos anti-garrapatas como el pasto Gordura (*Melinis minutiflora*) e Insurgentes (*Brachiaria brizantha*) y leguminosas del género *Stylosanthes spp* (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 1999, 2004).

#### **Control inmunológico**

La única vacuna comercialmente disponible contiene 100 µg del antígeno recombinante Bm86, el cual es una proteína de la superficie del intestino de la garrapata. Esta vacuna, confiere una protección promedio del 50% con base en la reducción del número de hembras que logran repletarse después de la infestación (Schetters *et al.*, 2016).

#### **Control químico**

Es el principal método empleado para el control de *R. microplus*, consiste en la aplicación sobre la piel de bovinos infestados con garrapatas, de ixodicidas sintéticos pertenecientes a las familias de los organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas y fluazurón (Hernández *et al.*, 2010). Su uso indiscriminado ha limitado su efectividad debido a la aparición de

poblaciones de garrapatas resistentes en el campo; a nivel mundial en países como Sudáfrica, Australia, USA, Colombia, Uruguay, Brasil, Argentina y México se han reportado garrapatas multiresistentes a los ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018). En México, los casos de multiresistencia se han documentado en los estados de Tabasco (Soberanes *et al.*, 2002), Veracruz (Fernández-Salas *et al.*, 2012) y Tamaulipas (Miller *et al.*, 2013).

### **Control biológico**

A la fecha no existen productos comercialmente disponibles, sin embargo, se han identificado enemigos naturales predadores de garrapatas como roedores, pavos, codornices, el parasitoide *Ixodiphagus hookeri*; nematodos del suelo de los géneros *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* los cuales infectan garrapatas con las bacterias *Xenorhabdus spp.* y *Photorhabdus spp.*; hongos de las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Lonc *et al.*, 2014) y bacterias *Bacillus thuringiensis* (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2010; Romo-Martínez *et al.*, 2013; Lormendez *et al.*, 2019).

### **Bacterias en suelos**

El suelo es reservorio de una amplia diversidad bacteriana determinada por factores como: luz solar, temperatura, pH, minerales, nutrientes entre otros. Entre esa diversidad se encuentran bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas que lo habitan de manera natural o introducidas a través de excretas de animales, cadáveres o inundaciones con aguas contaminadas (Baumgardner 2012; Iwu 2019).

### **Bacterias en garrapatas**

La presencia de bacterias en *R. microplus* se ha demostrado mediante el uso de herramientas de secuenciación masiva, se tienen identificados 62 géneros y siete especies de bacterias encontrados en diferentes órganos (intestinos y ovarios) y diferentes estadios (huevos, hembras y machos adultos) entre los que se encuentran algunos descritos como patógenos de artrópodos (Andreotti *et al.*, 2011). En huevos de garrapata (*Amblyomma cajennense*) se reportan ocho géneros de bacterias (Machado-Ferreira *et al.*, 2015). Otras bacterias de los géneros

*Borrelia* y *Rickettsia* se han reportado como patógenos de garrapatas por provocarles daños en diferentes órganos (glándulas salivales, ovarios, tubos de Malphigi y células epiteliales del intestino) e incluso causándoles la muerte (Hassanainm *et al.*, 1997; Samish y Rehacek 1999).

### **Factores de virulencia asociados a bacterias**

Bacterias clasificadas dentro de la familia Bacillaceae son las más conocidas empleadas como agentes de biocontrol al producir proteínas tóxicas para insectos lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros e himenópteros; y en arácnidos como varroa y garrapatas. La especie *Bacillus thuringiensis* representa a la bacteria más conocida empleada como agente de biocontrol; durante la esporulación sintetiza cristales de protoxinas llamadas Cry y Cyt, durante la fase de crecimiento secreta proteínas conocidas como Vip y Sip (Vegetative insecticidal proteins y Secreted insecticidal protein), así como también proteínas de la capa-S y diferentes toxinas que afectan artrópodos (Palma *et al.*, 2014; Alquisira-Ramírez *et al.*, 2014; Lormendez *et al.*, 2019). La especie *B. cereus* produce enzimas degradadoras (fosfolipasas C, shingomielinasas, proteinasas, colagenasa, nucleasas) proteínas citotóxicas (enterotoxinas, hemolisinas), proteínas de superficie celular (flagelina, proteínas de la capa-S) así como también metabolitos secundarios (Lonc *et al.*, 2014). Otras especies de bacilos como *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son productores de biosurfactantes los cuales han mostrado efecto contra dípteros y áfidos (Geetha y Manonmani 2010; Yun *et al.*, 2013).

Algunas enterobacterias de los géneros *Serratia*, *Yersinia*, *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* aisladas de larvas de insectos muertos, han mostrado tener efecto insecticida contra diferentes especies de coleópteros, lepidópteros y ortópteros (Johnson *et al.*, 2001; Townsend *et al.*, 2004; Nuñez-Valdez *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2010; Hurst *et al.*, 2011; Bidari *et al.*, 2017). En *Serratia* se han descrito factores de virulencia como la motilidad, la formación de biofilms, la producción de hemolisinas, la formación de fimbrias para adherencia y la producción de enzimas hidrolíticas con capacidad para degradar carbohidratos (Mahlen 2011; Veliz *et al.*, 2017). *Yersinia* es tóxica para invertebrados debido a que produce un complejo de toxinas (TC) el cual ha sido poco estudiado (Springer *et al.*, 2018). Los principales factores de virulencia producidos por *Photorhabdus spp* son las toxinas Mcf (makes

Caterpillar floppy), tc (toxin complex) y Pir (*Photorhabdus* insect related); las cuales son proteínas que reorganizan el citoesqueleto de actina e inducen apoptosis en hemocitos y tejido epitelial; tienen actividad en células epiteliales intestinales, así como actividad neurotóxica; en el caso de *Xenorhabdus spp.* se han identificado una serie de toxinas llamadas: A24tox, xptA1, xptA2, xptB1, xptC1, Xin, XaxA, XaxB y la proteína insecticida HIP57 (Castagnola y Stock, 2014).

En bacterias del orden Pseudomonadales como *Pseudomonas spp.* se ha identificado que producen diferentes biosurfactantes (rhamnolípidos, orfamida A, xantolisinas A y B) los cuales han mostrado tener efecto insecticida contra el afido *Myzus persicae* ya que causan daño a la membrana de la cutícula (Kim *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2017).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a los incrementos de casos de resistencia de la garrapata *Rhipicephalus microplus* hacia los garrapaticidas comerciales provocados por el control químico, es necesaria la búsqueda de métodos alternativos para el control de este ectoparásito en el ganado. Por lo que bacterias patógenas como agentes de control biológico, podrían ayudar en el combate de *R. microplus*, reduciendo la contaminación ambiental y retardando la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Al menos una de las bacterias aisladas en el presente estudio será patógena a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

## OBJETIVO GENERAL

Aislar bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluar su efecto letal sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar y seleccionar *in vitro* bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
- 2) Identificar taxonómicamente bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
- 3) Caracterizar la patogenicidad y virulencia de la bacteria con efecto ixodicida hacia la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
- 4) Analizar la histoarquitectura de garrapatas *Rhipicephalus microplus* afectadas por la bacteria patógena.
- 5) Identificar la presencia de quitinasas en la bacteria patógena a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
- 6) Evaluar *in vitro* la toxicidad de la cepa EC-35 hacia el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

## REFERENCIAS

- Alquisira-Ramírez EV, Paredes-Gonzales JR, Hernández-Velázquez VM, Ramírez-Trujillo JA, Peña-Chora G (2014) *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie* 45:707-718.
- Andreotti R, Pérez de LAA, Down SE, Guerrero FD, Bendele KG (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through taq-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology* 11:6.
- Baker AS (1999) Mites and ticks of domestic animals: an identification guide and information source. London: The stationary office 172-173.
- Baumgardner DJ (2012) Soil-related bacterial and fungal infections. *J Am Board Fam Med* 25(5):734-744.
- Bidari F, Shams-Bakhsh M, Mehrabadi M (2017) Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). *Journal of Applied Entomology*. 1-11.
- Castagnola A, Stock P (2014) Review: Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. *Insects*. 5:139-166.
- Dantas-Torres F. (2018) Species Concepts: What about Ticks? *Trends Parasitol.*34(12):1017-1026.
- Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Romo-Martínez A, Hernández-Velázquez V, Bravo A, Pérez D (2010) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *J Insect Sci* 10(186):1-6.
- Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA (2012) First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 183:338-342.
- Geetha I, Manonmani AM (2010) Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its

pupicidal efficacy. Letters in Applied Microbiology 51:406-412.

González Sáenz PJR, Hernández OR (2012) *Boophilus microplus*: estado actual de la Resistencia a los acaricidas en la frontera México Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. Rev Mex Cienc Pecu. 3:1-8.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, Shao R, Barker S (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida) of the World: a list of valid species names. Zootaxa 2528:1-28.

Hassanainm MA, El Garhy FM, Abdel-Ghaffar AF, El-Sharaby A, Abdel Megeed NK (1997) Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae). Parasitol Res 83:209-213.

Hernández OR, Falcón NA, García OMA, Palacios FA, Mosqueda GJJ, Preciado TJF, Mejía EF, Ramos AJA, Rosas PJ, Cantú CA, Rojas REE, Alpirez MF, Vega MCA, Solís CJJ, Rodríguez CSD (2010) Control integrado de garrapatas y enfermedades que transmiten en ganado bovino, Babesiosis y anaplasmosis. Folleto técnico INIFAP 10:1-31.

Hurst MRH, Becher SA, Young SD, Nelson TL, Glare TR (2011) *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. Int J Syst Evol Microbiol. 61:844-849.

Iwu CD, Okoh AI (2019) Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. Int J Environ Res Public Health. 16(4407):1-34.

Jang JY, Yang SY, Kim YC, Lee CW, Park MS, Kim JC Kim IS (2013) Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6. J. Agric. Food Chem. 61:6786-6791.

Jeong H, Mun H, Oh H, Kim S, Yang H, Kim I, Lee H (2010) Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia* sp. EML-SE1 against diamondback moth. J Microbiol. 48(4):541-545.

Johnson VW, Pearson JF, Jackson TA (2001) Formulation of *Serratia entomophila*

for biological control of grass grub. *Pasture Weeds & Pest. N. Z. and Plant Prot.* 54:125-127.

Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129:S3-S14.

Kim SK, Kim YC, Lee S, Kim JC, Yun MY, Kim IS (2011) Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas sp.* EP-3 against green peach aphid (*Mizus persicae*). *J. Agric. Food Chem.* 59:934-938.

Lim DJ, Yang SY, Noh MY, Lee CW, Kim JC, Kim IS (2017) Identification of lipopeptide xantholysins from *Pseudomonas sp.* DJ15 and their insecticidal activity against *Myzus persicae*. *Entomological research* 47:337-343.

Lonc E, Guz-Regner K, Kiewra D, Szczepanska A (2014) Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. *Annals of Parasitology* 60(3):169-177.

Lormendez C, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez V, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramirez G, Lina-Garcia L, Peña-Chora G (2019) Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* 9:17586.

Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS, Soares CA (2015) Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genet Mol Biol* 38(4):477-483.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4):755-791.

Miller RJ, Almazán C, Ortíz-Estrada M, Davey RB, George JE, De León AP (2013) First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of México. *Vet. Parasitol.* 191:97-101.

Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA (2017) *Ticks of the Southern cone of America: diagnosis, distribution and hosts with importance, ecology, and sanitary importance*. Elsevier, London. 372 pp.

Núñez JL, Muñoz CME, Moltedo HL (1982) Cap IV. Ciclo biológico en *Boophilus*

*microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur 53-66.

Núñez-Valdez ME, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, Gutierrez M del C, Villalobos FJ (2008) Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). Appl. Environ. Microbiol. 74(3):802-810.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins 6:3296-3325.

Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez LAA, Silva VH, Torres-Acosta JFJ, Fragoso SH, Romero SD, Rosario CR, Saldiernah F, García CD (2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Rev Mex Cienc Pecu. 8(1):61-74.

Rodríguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. Parasitol Res 117:3-29.

Romo-Martínez A, Fernández-Ruvalcaba M, Hernández-Velázquez VM, Peña-Chora G, Lina-García LP, Osorio-Miranda J (2013) Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. Basic Res J Agric Sci. Rev. 2(3):64-79.

Samish M, Rehacek J (1999) Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. Ann Rev Entomol 44:159-182.

Schettters T, Bishop R, Crampton M, Kopaceks P, Lew-Tabor A, Maritz-Olivier C, Miller R, Mosqueda J, Patarroyo J, Rodriguez-Valle M, Scoles G, de la Fuente J (2016) Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. Parasites & Vectors 9(105): 1-7.

Soberanes CN, Santamaría VM, Fragoso SH, García VZ (2002) Primer caso de Resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. Téc Pecu Méx 40(1): 81-92.

Springer K, Sängler P-A, Moritz C, Felsl A, Rattei T, Fuchs TM (2018) Insecticidal

toxicity of *Yersinia frederiksenii* involves the novel enterotoxin YacT. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8(392):1-13.

Townsend RJ, Ferguson CM, Proffitt JR, Slay MWA, Swaminathan J, Day S, Gerard E, Callaghan MO, Johnson VW, Jackson TA (2004) Establishment of *Serratia entomophila* after application of a new formulation for grass grub control. Insect in Pasture. N. Z. and Plant Prot. 57: 310-313.

Veliz E, Martinez-Hidalgo P, Hirsch AM (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. AIMS Microbiology 3(3):689-705.

Yun DC, Yang SY, Kim YC, Kim IS, Kim YH (2013) Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. J Korean Soc Appl Biol Chem 56:751-753.

## Capítulo 1

### Aislamiento y selección *in vitro* de bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*

#### RESUMEN

Las bacterias reportadas asociadas a garrapatas *R. microplus* se localizan en diferentes órganos y estadios de su ciclo de vida, las garrapatas también llegan a tener contacto con las bacterias del suelo tanto en su fase de vida libre como parasita. El objetivo de este trabajo fue: aislar y seleccionar *in vitro* bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*. En los meses de febrero hasta noviembre del 2018 se colectaron muestras de garrapatas y suelo en diferentes ranchos ganaderos de México; las muestras se llevaron a laboratorio, y las garrapatas que mostraron algún síntoma de enfermedad o murieron sin lograr ovipositar fueron seleccionadas, fragmentadas y mantenidas en medio de cultivo LB líquido para permitir el crecimiento de bacterias; el mismo procedimiento se aplicó con las muestras de suelo. Los cultivos se usaron como inóculo para estriar en cajas con medio LB agar en donde se seleccionaron colonias únicas fenotípicamente diferentes, las cuales se expandieron y criopreservaron identificándose con las siglas EC seguidas de un número consecutivo. Las bacterias criopreservadas fueron empleadas en bioensayos de tamizaje mediante la prueba de inmersión de larvas para la selección de muestras de bacterias con efecto ixodicida. Se obtuvieron muestras de suelo y garrapatas de 16 diferentes ranchos. Se aislaron 83 muestras de bacterias de suelo y garrapatas muertas. Solamente la muestra EC-35 mostró efecto ixodicida en la prueba de tamizaje hacia larvas de garrapatas *R. microplus*, mostrando un  $35.49 \pm 1.49$  % de mortalidad contra un  $8.85 \pm 0.54$  % del grupo testigo. El bacterioma de *Rhipicephalus microplus* reporta la presencia de las especies de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus sciuri*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium glutamicum* y *Fingoldia magna* y otros 147 géneros de bacterias. Las bacterias Gram negativas y positivas producen secreciones tóxicas para artrópodos, las cuales podrían ser las responsables del efecto ixodicida de la muestra de bacterias reportada. En este trabajo se aisló y seleccionó una muestra de bacterias con efecto ixodicida a larvas de garrapatas

*Rhipicephalus microplus* a partir de una garrapata muerta procedente de un rancho ubicado en el municipio de Soto La Marina, en el Estado de Tamaulipas, México.

## INTRODUCCIÓN

La presencia de bacterias en garrapatas *R. microplus* se ha demostrado mediante el uso de herramientas de secuenciación masiva, se tienen identificados 147 géneros y siete especies de bacterias encontrados en diferentes órganos (intestinos, ovarios y glándulas salivales) y diferentes estadios (huevos, ninfas, hembras y machos adultos) entre los que se encuentran algunos descritos como patógenos de artrópodos (Andreotti *et al.*, 2011; Segura *et al.*, 2020; Rojas-Jaimes *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). En huevos de otra especie de garrapata (*Ambyomma cajennense*) se reporta la presencia de 8 géneros de bacterias (Machado-Ferreira *et al.*, 2015). Otras bacterias de los géneros *Borrelia* y *Rickettsia* se han reportado como patógenos de garrapatas por provocarles daños en diferentes órganos (glándulas salivales, ovarios, tubos de Malphigi y células epiteliales del intestino) e incluso causarles la muerte (Hassanainm *et al.*, 1997; Samish y Rehacek 1999).

El suelo es reservorio de una amplia biodiversidad bacteriana determinada por diversos factores como: luz solar, temperatura, pH, minerales, nutrientes entre otros. Entre esa diversidad se encuentran bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas que lo habitan de manera natural o introducidas a través de excretas de animales, cadáveres o inundaciones con aguas contaminadas (Baumgardner 2012; Iwu 2019).

El objetivo de este experimento fue: aislar y seleccionar *in vitro* bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zonas de muestreo

Durante los meses de febrero a noviembre del 2018, se realizó un muestreo al azar por conveniencia de especímenes de garrapatas y suelos, en ranchos productores de ganado bovino, previa autorización del propietario, en estados cerca de las costas del Golfo de México y el Océano Pacífico desde las coordenadas

17°59'20.3"N, 90°56'14.1"W hasta 23°19'38.6"N, 97°58'24.8"W; y de 19°51'25.5"N, 103°46'24.7"W hasta 21°49'23.6"N, 105°11'02.7"W; en los municipios de: Soto La Marina, Mezquital, Coatzintla, Candelaria, Tizimin, Jiutepec, Ocotlán, Tapalpa, Santiago Ixcuintla y Lázaro Cárdenas pertenecientes a los Estados de: Tamaulipas, Durango, Veracruz, Campeche, Yucatán, Morelos, México, Jalisco, Nayarit y Michoacán. Las garrapatas se colectaron de diferentes animales de 20 a 60 especímenes por rancho. El suelo se tomó de los potreros en un área de 1 m<sup>2</sup> desde la superficie hasta una profundidad máxima de 15 cm.

### **Sitio de estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología Vegetal, del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y en el Laboratorio de Artrópodos, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID SAI / INIFAP), en Jiutepec, Morelos.

### **Aislamiento y cultivo de bacterias**

Las garrapatas colectadas se colocaron en cajas de Petri y fueron puestas en una incubadora bajo condiciones de humedad y temperatura controlada 27 °C y 80% de humedad relativa para permitir la oviposición. Diez días después, se observaron las cajas de Petri y se seleccionaron las garrapatas muertas, con síntomas de enfermedad o que no hubieran logrado ovipositar. Las garrapatas seleccionadas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% durante 10 segundos y lavadas dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron de forma individual en tubos para microcentrifuga donde se fragmentaron usando una aguja de disección estéril, adicionando 1 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB). Las muestras de suelo fueron homogenizadas y se tomó 1 g por muestra el cual se colocó individualmente en un tubo estéril con capacidad para 15 ml, a cada tubo se le colocaron 10 ml de LB. Las garrapatas muertas y las muestras de suelo mezcladas con medio de cultivo se incubaron durante 24 h a 30 °C.

Después, estos cultivos se usaron como inóculo para estriar cajas de Petri con medio LB sólido empleando un asa de siembra bacteriológica y, se incubaron nuevamente a 30 °C durante 24 h con el fin de obtener colonias únicas. Se

seleccionaron colonias fenotípicamente diferentes las cuales fueron cultivadas de forma individual en medio LB sólido. Las colonias crecidas y expandidas se mezclaron con medio LB líquido y un 25% de glicerol, las mezclas se colocaron en tubos para crio preservación en un volumen final de 1 ml almacenándose a -20 °C hasta su uso; los tubos se identificaron con las iniciales EC seguidas de un numero en orden consecutivo.

Previo a los bioensayos con las garrapatas, los tubos que contenian las bacterias crio preservadas se descongelaron colocándose en hielo durante 15 minutos y se usaron como inóculos en cultivos de 25 ml de medio LB. El medio LB se complementó agregando otros reactivos de la siguiente forma (en gramos por litro): NH<sub>4</sub>Cl, 1.07; KCl, 1.5; Tris, 18.91; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.19; glucosa, 5. Los cultivos se incubaron con agitación constante a 200 rpm y 30 °C durante 4 días. El cultivo completo se utilizó para hacer bioensayos en pruebas de tamizaje, se seleccionaron aquellos cultivos que mostraron contener bacterias patógenas a garrapatas.

## **Bioensayos**

### **Cultivo de garrapatas**

Los bioensayos se realizaron utilizando garrapatas (*R. microplus*) cepa Media Joya aislada originalmente en Tapalpa, Jalisco, México, la cual es susceptible a ixodicidas y es mantenida mediante infestaciones artificiales en bovinos dentro de las instalaciones del CENID-SAI / INIFAP. Para obtener garrapatas hembras repletas, un bovino raza Holstein-Friesian de 120 kg de peso, fue infestado con 0.5 g de garrapatas en estadio de larva para desarrollar la fase de vida parasitaria. Veintiún días después de la infestación, se colectaron directamente de la piel del bovino garrapatas hembras repletas las cuales se usaron en los bioensayos y en la obtención de huevos y posteriormente larvas.

### **Prueba de Inmersión de Larvas**

En las pruebas de tamizaje la evaluación de la patogenicidad de bacterias contra larvas de garrapatas se llevó a cabo mediante la Prueba de Inmersión de Larvas (PIL) descrita por Klafke *et al.*, 2006. El bioensayo se realizó con larvas sin alimentar de 30-40 días de edad. En un tubo para micro centrifuga de 1.5 ml fueron agregados

1 ml del cultivo completo de bacterias y Tween-20® a una concentración final del 1%. Se realizó la inmersión de 100 larvas durante 10 minutos, al finalizar las larvas fueron colocadas en paquetes de papel filtro e incubadas durante 72 horas a  $27 \pm 2$  °C con una humedad relativa superior al 80%, pasado ese tiempo se evaluó la tasa de mortalidad. Las larvas con capacidad de locomoción fueron consideradas vivas y aquellas sin movimiento se consideraron muertas. El grupo testigo recibió medio de cultivo estéril y Tween-20 a la misma concentración. El bioensayo se realizó por triplicado.

## RESULTADOS

### Zonas de muestreo

Se obtuvieron muestras de suelo y garrapatas procedentes de 16 ranchos ubicados en los estados de: Tamaulipas, Durango, Veracruz, Campeche, Yucatán, Morelos, Estado de México, Jalisco, Nayarit y Michoacán. Obteniéndose un total de 160 garrapatas adultas muertas o con signos de enfermedad.

### Aislamiento y selección de bacterias

Se aislaron 83 muestras de bacterias de suelo y garrapatas muertas. La mortalidad en 82 muestras no fue significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al testigo. Solamente la muestra EC-35 mostró efecto patógeno en la prueba de tamizaje hacia larvas de garrapatas *R. microplus*. Observándose un  $35.49 \pm 1.49$  % de mortalidad contra un  $8.85 \pm 0.54$  % del grupo testigo.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La presencia de bacterias patógenas en diferentes estadios de garrapatas *R. microplus* ha sido previamente reportada (Andreotti *et al.*, 2011; Rojas-Jaimes *et al.*, 2021); lo cual concuerda con lo observado en el presente estudio, en donde a partir de un cultivo de bacterias obtenido por inoculación del contenido interno de una garrapata muerta, se logró seleccionar una bacteria con efecto ixodicida; pero en los reportes previos, no se desafiaron garrapatas con bacterias. Hasta ahora, las bacterias reportadas con efecto acaricida pertenecen a la especie *B. thuringiensis*, las cuales son letales hacia los ácaros *Varroa destructor* (Alquisira-

Ramírez *et al.*, 2014) *Psoroptes cuniculi* (Dunstand-Guzmán *et al.*, 2015), *Argas persicus* (Hassanain *et al.*, 1997), *Ornithodoros erraticus* (Samish *et al.*, 1999), *Hyalomma dromedarii* (Hassanain *et al.*, 1997), *Ixodes scapularis* (Zhioua *et al.*, 1999) y *R. microplus* (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2010; Romo-Martínez *et al.*, 2013; Lormendez *et al.*, 2019). Lo cual hace que sea necesario realizar la identificación taxonómica para determinar a qué especie de bacteria pertenece.

En este trabajo de entre 83 bacterias, se aisló y seleccionó una con efecto ixodicida a larvas de garrapatas *R. microplus* a partir de una garrapata muerta procedente de un rancho ubicado en el municipio de Soto La Marina, en el estado de Tamaulipas, México.

## REFERENCIAS

Alquisira-Ramírez EV, Paredes-Gonzalez JR, Hernández-Velázquez VM, Ramírez-Trujillo JA, Peña-Chora G (2014) *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie* 45:707–718

Andreotti R, Pérez de LAA, Down SE, Guerrero FD, Bendele KG (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through taq-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology* 11:6.

Baumgardner DJ (2012) Soil-related bacterial and fungal infections. *25(5):734-744.*

Dunstand-Guzmán E, Peña-Chora G, Hallal-Calleros C, Pérez-Martínez M, Hernández-Velazquez VM, Morales-Montor J, Flores-Pérez FI (2015) Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*. *Parasit Vectors* 8:285.

Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Romo-Martínez A, Hernández-Velázquez V, Bravo A, Pérez D (2010) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *J Insect Sci* 10(186):1-6.

Hassanainm MA, El Garhy FM, Abdel-Ghaffar AF, El-Sharaby A, Abdel Megeed NK (1997) Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae). *Parasitol Res*

83:209-213.

Iwu CD, Okoh AI (2019) Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 16(4407):1-34.

Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS (2006) Larval immersion test with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 142:386-390.

Lormendez C, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez V, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramírez G, Lina-García L, Peña-Chora G (2019) Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Scientific Reports*. 9, 17586.

Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS, Soares CA (2015) Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genet Mol Biol* 38(4):477-483.

Rojas-Jaimes J, Lindo-Seminario D, Correa-Núñez G, Diringer B. (2021) Characterization of the bacterial microbiome of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from Pecari tajacu "Sajino" Madre de Dios, Peru. *Sci Rep*.11(1):6661.

Romo-Martínez A, Fernández-Ruvalcaba M, Hernández-Velázquez VM, Peña-Chora G, Lina-García LP, Osorio-Miranda J (2013) Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Res J Agrric Sci Rev* 2(3):64-79.

Samish M, Rehacek J (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* 44:159-182.

Segura JA, Isaza JP, Botero LE, Alzate JF, Gutiérrez LA (2020) Assessment of bacterial diversity of *Rhipicephalus microplus* ticks from two livestock agroecosystems in Antioquia, Colombia. *PLoS ONE* 15(7): e0234005.

Zhang XL, Deng YP, Yang T, Li LY, Cheng TY, Liu GH, Duan DY (2022)

Metagenomics of the midgut microbiome of *Rhipicephalus microplus* from China. *Parasit Vectors*.15(1):48.

Zhioua E, Heyer H, Browning M, Ginsberg HS, LeBrun RA (1999) Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *Kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 36(6): 900-902.

## Capítulo 2

### Identificación taxonómica de bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*

#### RESUMEN

Los principales métodos para la identificación de bacterias con uso potencial como agentes de control microbiano son tres: fenotípicos, proteómicos y moleculares. Los métodos moleculares se basan en amplificación y secuenciación de genes altamente conservados y de distribución universal; entre estos genes están el 16S rRNA y *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa). El objetivo de este estudio fue: identificar taxonómicamente bacterias con efecto ixodicida a la garrapata *Rhipicephalus microplus*. La muestra de bacterias EC-35 se cultivó en 10 mL de medio líquido LB, a las 12 h de crecimiento se tomó 1 mL del cultivo para hacer la extracción de DNA. Los genes se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar el gen 16S rRNA se utilizaron oligonucleótidos universales previamente reportados, sentido 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' y reverso 5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'. Para amplificar el gen *rpoB* se utilizaron los oligonucleótidos sentido (M<sub>7</sub>) 5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G -3' y reverso (CM<sub>31B</sub>) 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'. Los productos de amplificación fueron visualizados, purificados, secuenciados y analizados. El análisis de las secuencias se realizó usando el programa BLAST del NCBI; el análisis filogenético se hizo por el método de inferencia bayesiana usando la plataforma CIPRES. Se obtuvieron productos de amplificación por PCR cerca de los marcadores de 1650 pb (16S rRNA) y 1000 pb (*rpoB*). Las secuencias mostraron un tamaño de 1432 y 990 nucleótidos respectivamente. Las secuencias de los genes de 16S rRNA y *rpoB* tuvieron identidad superior al 99% con bacterias de la especie *Serratia marcescens*. El gen 16S rRNA tuvo mayor identidad con la cepa SYJ1-9 número de acceso KR262852.1; el gen *rpoB* con la cepa K10 número de acceso CP027798. Los análisis filogenéticos revelaron que los genes de la muestra EC-35 se agrupan en el clado de *Serratia marcescens* mostrando topología con las especies *S. nematodiphila*, *S. ureilytica* y *S. rubidaea*. El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias Gram Negativas con forma de bacilos, se les ha encontrado en una amplia variedad de hábitats como

agua, aire, suelo, plantas, humanos e insectos. El análisis de identidad con los marcadores moleculares genes 16S rRNA y *rpoB* corrobora su identidad con la especie *S. marcescens*. El análisis de inferencia filogenética de la muestra de bacterias EC-35 con efecto ixodicida hacia larvas de garrapatas *R. microplus* indicó que pertenece a la especie *S. marcescens*.

## INTRODUCCIÓN

La identificación de bacterias con uso potencial como agentes de control microbiano, es el paso a seguir una vez que se cuenta con algún candidato a ser utilizado como agente de biocontrol en alguna población de artrópodos blanco. La identificación se realiza principalmente mediante alguno de los tres métodos: fenotípicos, proteómicos y moleculares; la identificación fenotípica se basa en la observación de características como: morfología, medios de cultivo óptimos y requisitos de crecimiento (Bou *et al.*, 2011); en los medios de cultivo se emplean cromógenos para lograr diferenciar entre géneros de bacterias (Kootallur *et al.*, 2011). Los métodos de identificación proteómica se basan en el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma bacteriano, empleando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight); con ésta técnica se detectan proteínas ribosómicas (fracciones mayor y menor) y citosólicas, lo cual guía en la identificación a nivel de especie tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas (Bou *et al.*, 2011; Dingle y Butler-Wu, 2013). Los métodos moleculares se basan en amplificación y secuenciación de genes, altamente conservados, de distribución universal, los cuales son usados como marcadores moleculares en estudios taxonómicos o de filogenia, estos genes se les conoce como: 16S rRNA, 16S-23S rRNA (espacio intergénico del 16S-23S rRNA), 23S rRNA, *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa) *gyrA* y *gyrB* (subunidad A y  $\beta$  de la DNA girasa) (Mollet *et al.*, 1997; Weigel *et al.*, 1998; Bou *et al.*, 2011; Ménard *et al.*, 2016).

El marcador molecular más ampliamente usado en estudios filogenéticos y taxonómicos de bacterias es el 16S rRNA debido a que presenta características como: (1) está presente en casi todas las bacterias, en ocasiones se encuentran como una familia multigénica u operones; (2) su función a través del tiempo no ha cambiado, lo que sugiere que los cambios al azar en la secuencia son una medida

más precisa en el tiempo (evolución); y (3) el tamaño el gen (1500 pb) es lo suficientemente grande para análisis bioinformáticos, ya que proporciona suficiente polimorfismo para establecer medidas estadísticas validas (Janda y Abbott, 2007; Bou *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue: identificar taxonómicamente la especie de la bacteria EC-35 con efecto ixodicida a la garrapata *R. microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extracción de DNA y amplificación por PCR

La muestra de la bacteria EC-35 se cultivó en medio LB agar solido de donde se tomó una colonia la cual se cultivó en 10 mL de medio LB líquido. La extracción de DNA total se realizó a partir de 1 mL de muestra de bacterias EC-35 con 12 h de crecimiento en medio líquido, siguiendo la metodología descrita por Bravo *et al.* (1998). Para las reacciones de PCR se utilizaron 100 ng de DNA y dos marcadores moleculares los genes 16S rRNA y *rpoB*.

Los genes se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar el gen 16S rRNA se utilizaron oligonucleótidos universales previamente reportados por Soufiane y Cote (2009), sentido 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' y reverso 5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'. Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 96 °C durante 10 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización (96 °C, 50 s), alineamiento (50 °C, 45 s) y extensión (72 °C, 1 min), con una extensión final de 72 °C por 10 min. Para amplificar el gen *rpoB* se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Mollet *et al.*, 1997, sentido (M<sub>7</sub>) 5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G -3' y reverso (CM<sub>31B</sub>) 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'; las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 96 °C durante 4 minutos; seguido de 40 ciclos de desnaturalización (96 °C, 60 s), alineamiento (55 °C, 30 s) y extensión (72 °C, 50 seg), con una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, posteriormente se purificaron usando el kit comercial (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system, Promega, USA) siguiendo las indicaciones del

fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados de manera comercial en el Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos.

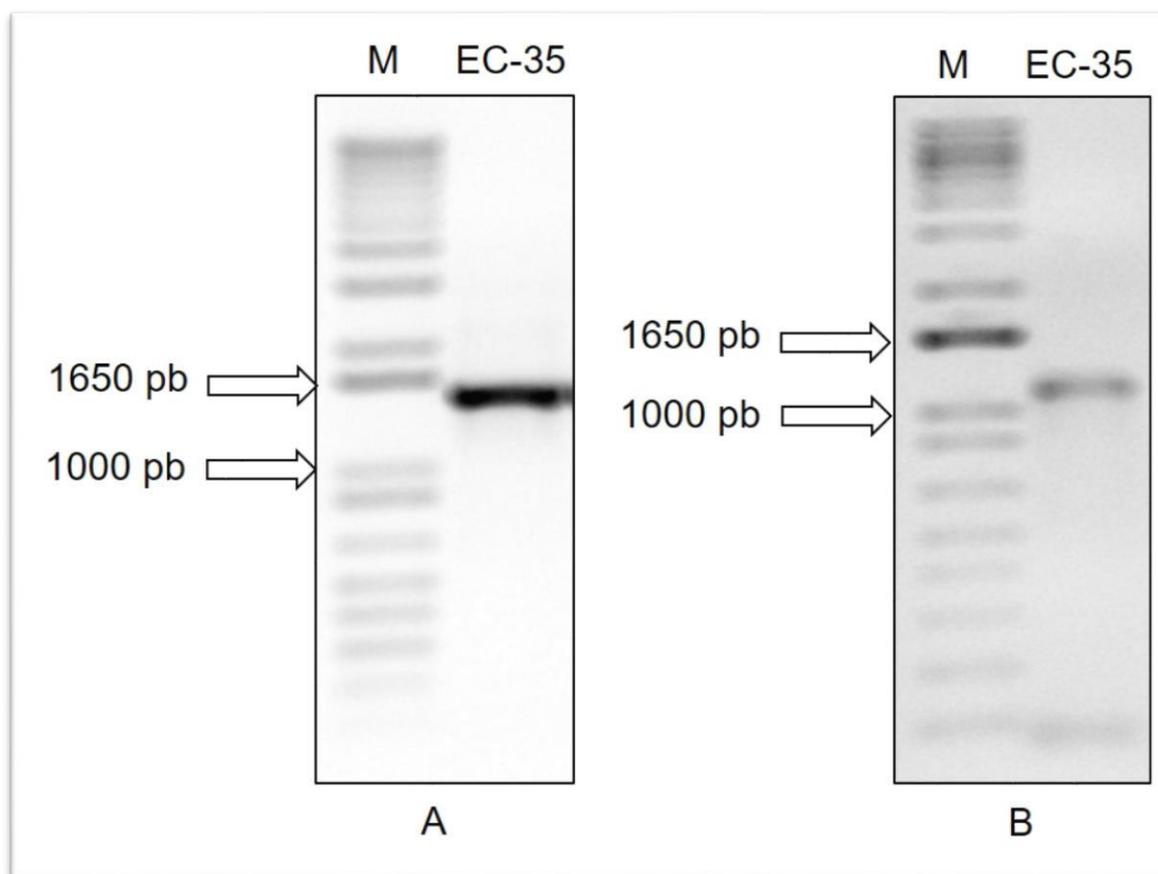
### **Análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas de los genes 16S rRNA y *rpoB* de la muestra de bacterias EC-35 fueron comparadas con aquellas previamente reportadas en la base de datos del GenBank del NCBI, usando el programa Blast. Una vez identificado el género se consultaron aquellas especies reportadas en la LPNS (Parte *et al.*, 2020) y se descargó una secuencia por cada especie de los genes 16S rRNA y *rpoB*; también las secuencias de genes de *Yersinia enterocolitica* lo cuales se usaron como grupo externo. Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el programa UGENE, después se realizó un análisis filogenético para hacer una comparación entre secuencias y determinar la relación evolutiva, así como su distancia genética por método de inferencia bayesiana usando la plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010).

## **RESULTADOS**

### **Amplificación de genes**

Los productos de amplificación por PCR al ser visualizado en un gel de agarosa, mostraron amplicones cerca del tamaño de 1650 pb (16S rRNA) y 1000 pb (*rpoB*) con respecto al marcador molecular (Figura 2.1). Las secuencias mostraron un tamaño de 1432 y 990 nucleótidos respectivamente.

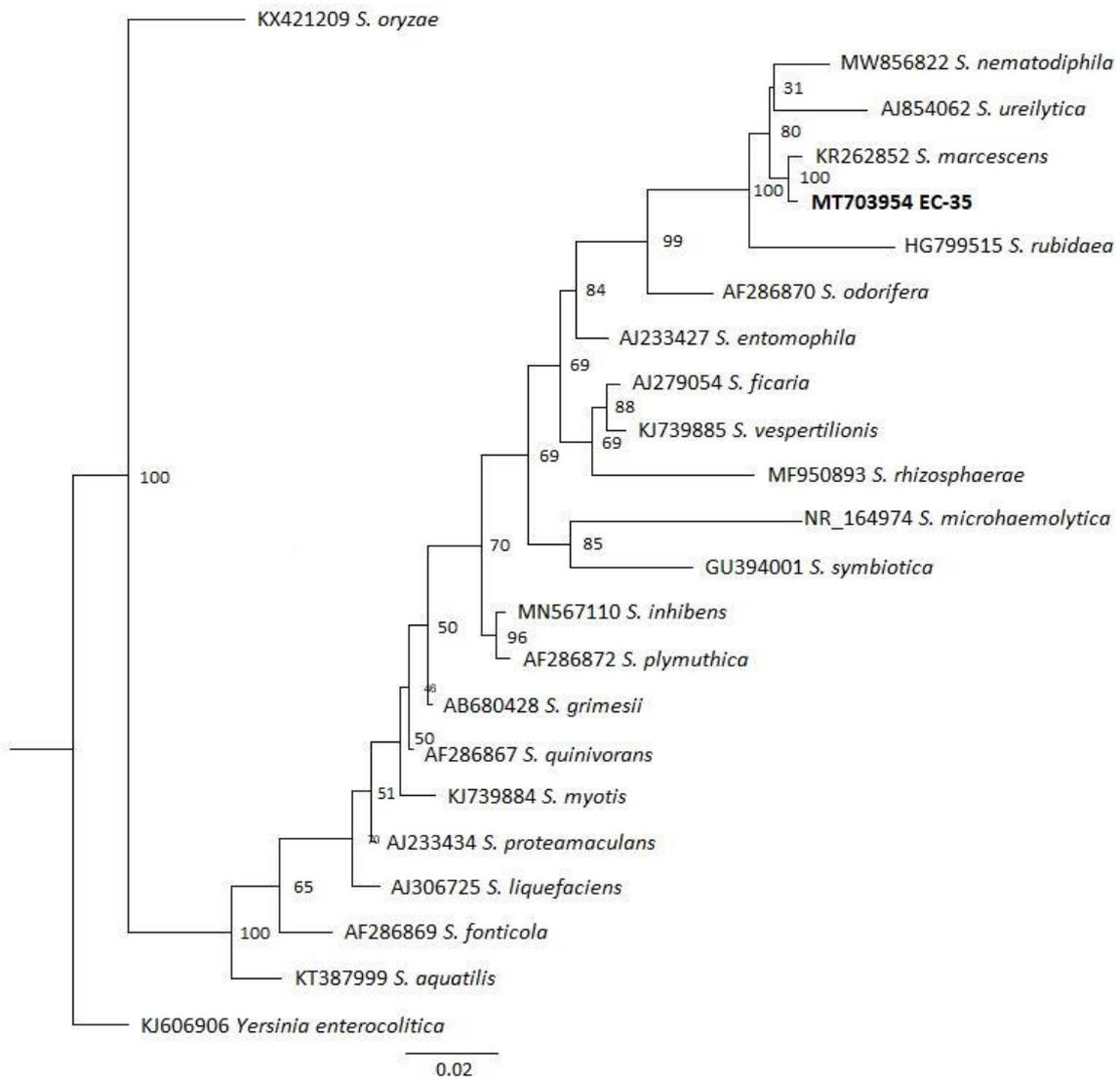


**Figura 2.1.** Imagen de los productos de amplificación por PCR de los genes 16S rRNA (A) y rpoB (B) de la muestra de bacterias EC-35. M = Marcador molecular de ácidos nucleicos.

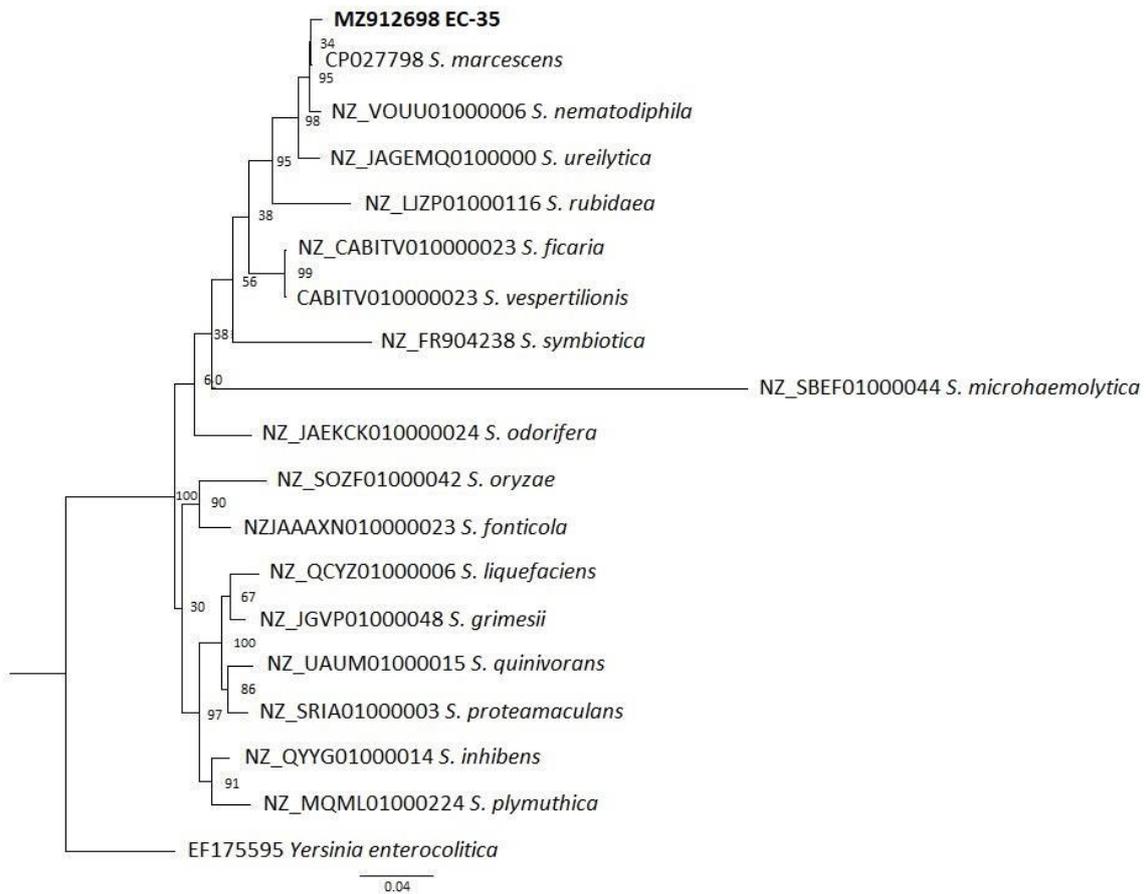
### Identificación de especie, muestra EC-35

Las secuencias de los genes de 16S rRNA y *rpoB* de la muestra EC-35 al ser comparada con las secuencias disponibles en el GenBank, tuvieron identidad superior al 99% con bacterias del género *Serratia*, el gen 16S rRNA tuvo mayor identidad con la cepa SYJ1-9 número de acceso KR262852.1; el gen *rpoB* con la cepa K10 número de acceso CP027798; ambas pertenecientes a la especie *S. marcescens*. Los análisis filogenéticos por el método de inferencia bayesiana revelaron que los genes de la muestra EC-35 se agrupan en el clado de *S. marcescens* (Figuras 2.2 y 2.3) mostrando topología con las especies *S. nematodiphila*, *S. ureilytica* y *S. rubidaea*. El análisis comparativo con diferentes secuencias de cepas de bacterias de las especies más cercanas, muestran una agrupación en clados en donde la muestra EC-35 se mantiene en el clado de *S. marcescens* (Figuras 2.4 y 2.5). Las secuencias de nucleótidos fueron depositadas en

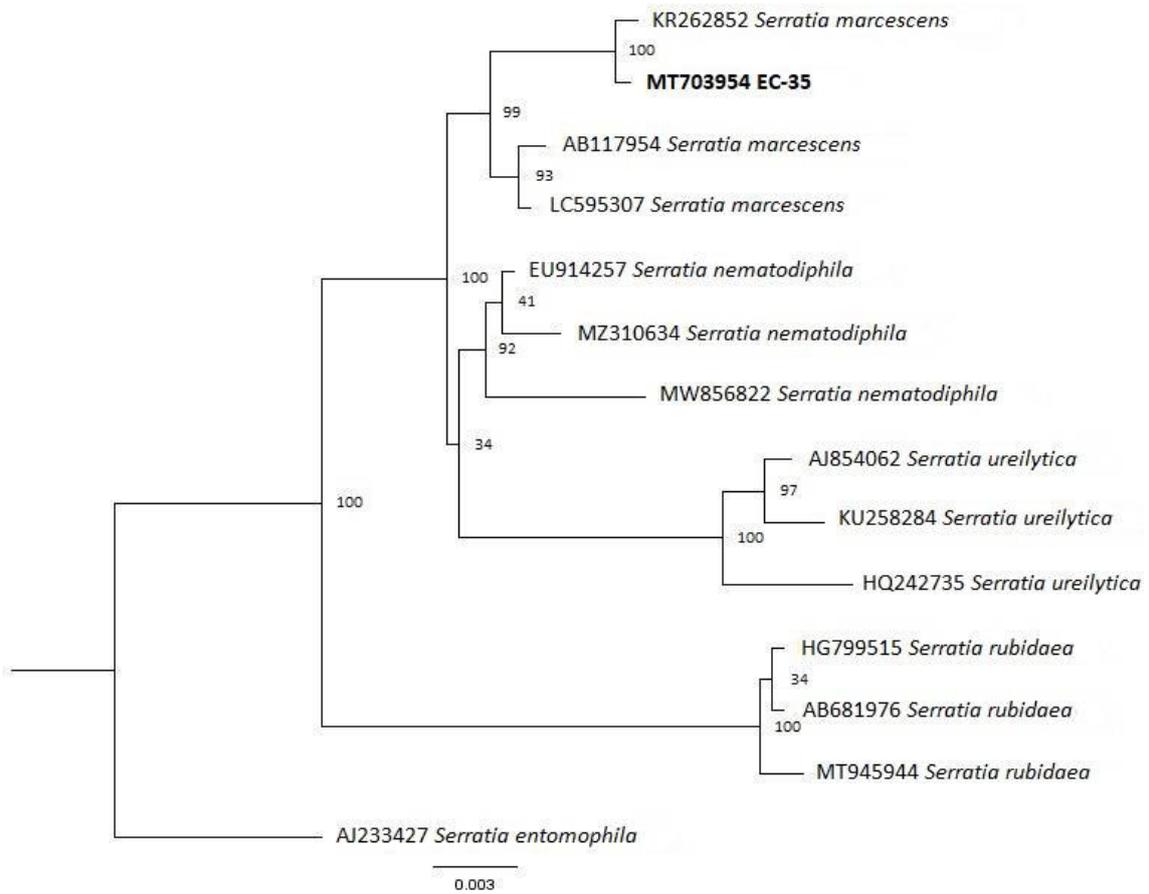
el GenBank con los números de acceso MT703954 para el gen 16S rRNA y MZ912698 para el gen rpoB.



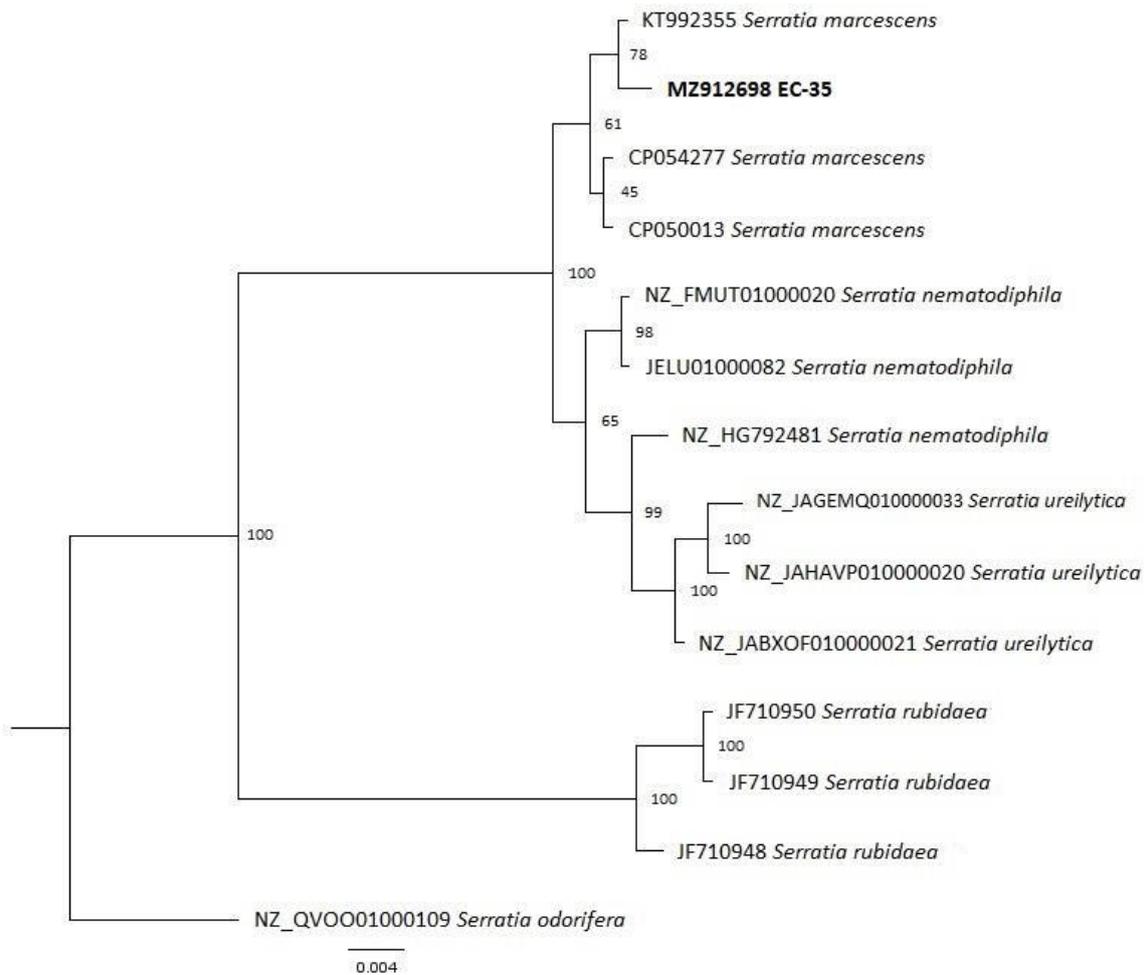
**Figura 2.2.** Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen 16S rRNA de 21 especies de bacterias del género *Serratia*; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.



**Figura 2.3.** Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen *rpoB* de la cepa EC-35 con 17 especies de bacterias del género *Serratia*; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.



**Figura 2.4.** Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen 16S rRNA de la cepa EC-35 con diferentes cepas de diferentes especies de bacterias del género *Serratia*; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.



**Figura 2.5.** Análisis filogenético de la cepa EC-35. Comparación del gen *rpoB* de la cepa EC-35 con diferentes cepas de diferentes especies de bacterias del género *Serratia*; se muestra el número de acceso de las secuencias de referencia antes del nombre de la especie. Inferencia bayesiana.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se identificó a la muestra de bacteria EC-35 como miembro del género *Serratia*. El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias pertenecientes al género *Serratia* están clasificadas en 23 especies (Parte *et al.*, 2020). Son bacterias Gram Negativas con forma de bacilos, algunas cepas producen un pigmento rojo llamado prodigiosina (Mahlen, 2011). Se les ha encontrado en una amplia variedad de hábitats como agua, aire, suelo, plantas, humanos e insectos (Grimont y Grimont, 1978; Mahlen, 2011). En insectos se les ha localizado infectando organismos enfermos y muertos, pertenecientes a los órdenes Ortóptera, Isóptera, Coleóptera, Lepidóptera, Himenóptera y Díptera

(Grimont y Grimont, 1978). Estas descripciones coinciden con lo observado en el presente trabajo, en donde a partir de una garrapata muerta, se logró aislar una bacteria la cual tuvo efecto ixodícida a larvas de garrapata.

El análisis de identidad para el gen 16S rRNA, nos indica que podría pertenecer a la especie *S. marcescens*. Sin embargo, estudios de secuenciación de genomas de diferentes cepas de *S. marcescens* mostraron la presencia de 6 y 7 operones (Li *et al.*, 2015), lo cual sugiere que el gen 16S rRNA no es el adecuado para realizar identificación a nivel de especie para este género de bacterias. La identificación usando el marcador molecular *rpoB* el cual codifica para una proteína concatenada altamente conservadas en bacterias, corrobora su identidad con la especie *S. marcescens*. La presencia del género *Serratia* ha sido identificado en glándulas salivales e intestino de *R. microplus* (Segura *et al.*, 2020). Otros autores estudiaron el bacterioma de garrapatas *R. microplus* y reportaron la presencia de *S. marcescens* en huevos (Andreotti *et al.*, 2011). En otro estudio secuenciando el gen 16S rRNA de bacterias cultivables obtenidas a partir de huevos de la garrapata *A. cajennense* se reportaron 17 diferentes especies de bacterias, entre ellas a *S. marcescens* (Machado-Ferreira *et al.*, 2015). En este trabajo se encontró la presencia de *S. marcescens* en una garrapata muerta, lo que difiere de lo reportado por Segura *et al.* (2020) quien la encontró en órganos de garrapatas vivas y la aisló mediante la técnica en medio de cultivo para poder identificarla a nivel de género; lo cual podría sugerir que las garrapatas se infectan con *Serratia* al momento de alimentarse.

## CONCLUSIÓN

El análisis filogenético de la muestra de bacterias EC-35 con efecto ixodícida hacia larvas de garrapatas *R. microplus* indicó que pertenece a la especie *S. marcescens*.

## REFERENCIAS

- Andreotti R, Pérez de LAA, Down SE, Guerrero FD, Bendele KG (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through taq-encoded pyrosequencing. BMC Microbiology. 11:6.
- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáenz-Nieto JA, Valdezate S (2011)

Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(8):601-608.

Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros E, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12), 4965-4972.

Dingle TC, Butler-Wu SM (2013) MALDI-TOF Mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* 33:589-609.

Grimont PAD, Grimont F (1978) The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:221-248.

Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2761-2764.

Kootallur BN, Thangavelu CP, Mani M (2011) Bacterial identification in the diagnostic laboratory: how much is enough? *Indian J Med Microbiol* 29(4):336-340.

Li P, Kwok AHY, Jiang J, Ran T, Xu D, Wang W, Leung FC (2015) Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLOS ONE* 10(4):1-22.

Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS, Soares CA (2015) Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genet Mol Biol.* 38(4):477-483.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to ocurrent practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4):755-791.

Ménard A, Buissonnière A, Prouzet-Mauléon V, Sifré E, Mégraud F (2016) The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter genus*. *Syst Appl Microbiol.* 39(2):77-87.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwatz T (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic tree" en *Proceedings of the Gateway Computing*

Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA. 1-8.

Mollet C, Drancourt M, Raoult D (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* 26(5):1005-1011.

Parte AC, Sarda Carbase J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M (2020) List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70:5607-5612.

Segura JA, Isaza JP, Botero LE, Alzate JF, Gutiérrez LA (2020) Assessment of bacterial diversity of *Rhipicephalus microplus* ticks from two livestock agroecosystems in Antioquia, Colombia. *PLoS ONE* 15(7): e0234005.

Soufiane B, Cote JC (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S RNA *gyrB* and *aroE* gene sequence analyze. *Anton V Leeuwen.* 95, 33-45.

Weigel LM, Steward CD, Tenover FC (1998) *gyrA* Mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2661-2667.

### Capítulo 3

#### Caracterización de la patogenicidad y virulencia de la bacteria con efecto ixodicida hacia la garrapata *Rhipicephalus microplus*

##### RESUMEN

Las bacterias son organismos con capacidad para enfermar y causar la muerte de artrópodos razón por la que son considerados como enemigos naturales. El objetivo de este experimento fue: caracterizar la patogenicidad de la bacteria con efecto ixodicida hacia la garrapata *R. microplus*. La bacteria de la muestra EC-35 se cultivó en medio LB líquido, durante 4 días. La pastilla de la bacteria se concentró por centrifugación para posteriormente solubilizarse en agua destilada estéril. La proteína total de la bacteria EC-35 se cuantificó mediante la técnica de Bradford. Los bioensayos de patogenicidad y virulencia con garrapatas se realizaron mediante: Prueba de Inmersión de Larvas, Prueba de Inmersión de Adultas, Prueba de Alimentación Capilar y Prueba de Inoculación en Celoma. Los datos se analizaron mediante la prueba t-student y análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey. La CL<sub>50</sub> se calculó mediante análisis Probit. En la Prueba de Inmersión de Larvas a las 24 horas post exposición a una concentración de 20 µg/ml de proteína de la muestra EC-35, la tasa de mortalidad del grupo tratado fue de 26.01 ± 1% y 3.14 ± 0.73% para el grupo testigo (p<0.05). No hubo diferencias en la tasa de mortalidad a mayor tiempo post exposición (p>0.05). Para la determinación de la virulencia las larvas de garrapata fueron expuestas a diferentes concentraciones de proteína total (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL) mostrando la tasa de mortalidad más baja a la concentración de proteína de 0.16 µg/mL con 17.36 ± 1.42%; en el grupo expuesto a la concentración de proteína de 40 µg/mL se observa la tasa de mortalidad más alta con 52.27 ± 1.37%. No se observaron diferencias significativas entre las cinco concentraciones de proteína más altas (p>0.05). La CL<sub>50</sub> fue de 13.89 µg/mL de proteína total. En la prueba de Inmersión de Hembras Adultas, el mayor porcentaje de mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje de control se alcanzó a la concentración de 10 µg/mL obteniéndose valores de 55.5, 50.9 y 52.5% respectivamente. En la Prueba de Alimentación Capilar administrando 10 µg/mL de sangre se obtuvo una mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje

de control del 90, 94.1 y 92.9% respectivamente. En la Prueba de Inoculación en Celoma con 0.05 µg de proteína se obtuvo una mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje de control del 90, 99.8 y 96.9% respectivamente. Se concluye que la muestra de la bacteria EC-35 de *S. marcescens* aislada de una garrapata muerta es patógena a garrapatas larvas y hembras adultas *R. microplus* bajo condiciones *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos que pueden provocar enfermedad y causar la muerte de artrópodos, ya que poseen la habilidad de penetrar hacia el interior del cuerpo y causar daño, razón por la que son considerados como enemigos naturales (Vega y Kaya, 2012).

El control biológico se refiere al uso de organismos vivos para disminuir las densidades poblacionales de algún artrópodo considerado como plaga. Usar microorganismos para el control biológico de artrópodos fue propuesto a mediados del siglo XIX (Schrank y Vainstein, 2010). Los microorganismos como las bacterias podrían ser una alternativa para el control de poblaciones de *R. microplus*. Las bacterias tienen capacidad de secretar proteínas tóxicas y producir metabolitos secundarios hacia el ambiente extracelular, contribuyendo así a la patogenicidad de la bacteria. Los géneros descritos como entomopatógenos están conformados por *Bacillus*, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Pseudomonas*, *Yersinia* y *Serratia* (McQuade *et al.*, 2018). Sin embargo, las únicas especies disponibles a nivel comercial son *B. thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus* y *Serratia entomophila* para controlar lepidópteros, dípteros y coleópteros (Johnson *et al.*, 2001; Townsend *et al.*, 2004; Lacey *et al.*, 2015). Para el caso de bacterias que han mostrado patogenicidad contra garrapatas *R. microplus* con efecto potencial para ser usados como agentes de biocontrol, existen algunos reportes de ensayos *in vitro* e *in situ* usando cepas de *B. thuringiensis* (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2010; Romo-Martínez *et al.*, 2013; Lormendez *et al.*, 2019). En el presente trabajo, una vez que fue seleccionada e identificada una cepa de bacteria con efecto ixodicida en garrapatas *R. microplus*, el siguiente paso consistió en realizar su caracterización, por lo que el objetivo de este experimento fue: caracterizar la patogenicidad de la bacteria *S. marcescens* hacia la garrapata *R. microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de bacterias

Las bacterias de la muestra EC-35 previamente almacenadas a -20 °C y crio preservadas en medio LB líquido y 25% de glicerol se descongelaron colocándose en hielo durante 15 minutos y se usaron como inóculos en cultivos de 25 ml de medio LB. El medio LB se complementó agregando otros reactivos de la siguiente forma (en gramos por litro): NH<sub>4</sub>Cl, 1.07; KCl, 1.5; Tris, 18.91; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.19; glucosa, 5. Los cultivos se incubaron con agitación constante a 200 rpm y 30 °C durante 96 hrs, posteriormente se concentró por centrifugación a 4500xg, desechando el sobrenadante, el concentrado se solubilizó en 3 mL de agua destilada estéril y se cuantificó la proteína total de bacterias EC-35 mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

### Bioensayos

#### Cultivo de garrapatas

Los bioensayos se realizaron utilizando garrapatas (*R. microplus*) cepa Media Joya aislada originalmente en Tapalpa, Jalisco, México, la cual es susceptible a ixodicidas y es mantenida mediante infestaciones artificiales en bovinos dentro de las instalaciones del CENID-SAI del INIFAP en Jiutepec, Morelos. Para obtener garrapatas hembras repletas, un bovino raza Holstein-Friesian de 120 kg de peso, fue infestado con 0.5 g de garrapatas en estadio de larva para desarrollar la fase de vida parasitaria. Veintiún días después de la infestación, se colectaron directamente de la piel del bovino garrapatas hembras repletas las cuales se usaron en los bioensayos y en la obtención de huevos y posteriormente larvas.

#### Prueba de Inmersión de Larvas

La evaluación de patogenicidad de la proteína cepa EC-35 contra larvas de garrapatas se llevó a cabo mediante la Prueba de Inmersión de Larvas (PIL) modificada descrita previamente por Klafke *et al.*, 2006. Las modificaciones a la técnica consistieron en reemplazar el fármaco y el Tritón X-100 por proteína total de bacterias EC-35 y Tween-20. El bioensayo se realizó con larvas sin alimentar a

una edad de 30-40 días. En un tubo para micro centrifuga de 1.5 mL fueron agregados 20 µg de proteína total, agua destilada estéril como diluyente y Tween-20 a una concentración final del 1%, en un volumen final de 1 mL. El grupo testigo recibió agua destilada estéril y Tween-20 a la misma concentración. A continuación, se realizó la inmersión de 300 larvas durante 10 minutos, al finalizar las larvas fueron colocadas en paquetes de papel filtro e incubadas durante 24 horas a  $27 \pm 2$  °C con una humedad relativa superior al 80%, pasado ese tiempo se evaluó la tasa de mortalidad. Las larvas con capacidad de locomoción fueron consideradas vivas y aquellas sin movimiento se consideraron muertas. Así mismo, se evaluó la tasa de mortalidad de larvas a los días 1, 2, 4 y 8 post inmersión. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

Para determinar la Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) de la proteína de la cepa EC-35 sobre larvas, se utilizaron diferentes concentraciones de proteína total (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL), la tasa de mortalidad fue cuantificada a los 4 días posterior a la exposición.

### **Prueba de Inmersión de Hembras Adultas**

El efecto de la proteína total de la cepa EC-35, fue evaluado en garrapatas hembras repletas, con tres repeticiones usando la Prueba de Inmersión de Adultas (PIA) (Drummond *et al.*, 1973), donde se determinaron las tasas de mortalidad, oviposición y eclosión de huevo (fertilidad). Se evaluaron seis concentraciones de proteína total (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL); utilizando agua destilada estéril y Tween 20® a una concentración final de 1%. Grupos de 15 garrapatas cada uno, con un peso promedio de  $4.65 \pm 0.027$  g se sumergieron durante 10 minutos en cada concentración de proteína total a razón de 1 mL por garrapata. El grupo testigo solo contenía agua destilada estéril con Tween 20®. Después de la exposición a la proteína total de bacterias patógenas, las garrapatas se colocaron de manera individual en placas de polietileno (Cell Wells, Corning Glass Works) de 24 pozos y se incubaron a 27 °C y 80% de humedad relativa durante 14 días. Diez días después de la exposición, se evaluó la tasa de mortalidad. Las garrapatas muertas se identificaron por mostrar oscurecimiento de cutícula, ausencia de movimiento en los túbulos de Malpighi y en los apéndices. A los 14 días se evaluó la tasa de oviposición pesando la masa de huevo, para evaluar los efectos de la infección

bacteriana en la fertilidad de los grupos de garrapatas. Los huevos se colectaron y colocaron en frascos de vidrio con tapón de algodón incubándose bajo las mismas condiciones que las garrapatas adultas durante 25 días, después se evaluó la tasa de eclosión de los diferentes tratamientos y se determinó el porcentaje de control.

### **Prueba de Alimentación Capilar**

Se siguió el método descrito por Gonsioroski *et al.* (2012). Garrapatas adultas semirepletas con un peso de 20 – 60 mg fueron colectadas directamente de la piel del bovino. Se formaron dos grupos de 10 garrapatas cada uno. Las garrapatas se colocaron sobre una placa de vidrio adheridas de forma dorsal con cinta adhesiva de doble cara. Las garrapatas del grupo tratado se alimentaron con sangre de bovino con heparina como anticoagulante y proteína de la cepa EC-35 a razón de 10 µg/mL. Con la mezcla se llenaron tubos capilares para microhematocrito los cuales se colocaron en el hipostóma de cada garrapata durante un periodo de 36 hrs. El grupo testigo se alimentó con sangre y agua destilada estéril. Pasado el tiempo de alimentación las garrapatas se incubaron de la forma anteriormente descrita durante 14 días, una vez transcurrido ese tiempo se determinó el porcentaje de control.

### **Prueba de Inoculación en Celoma**

Se siguió el método descrito por Almazán *et al.* (2010). Garrapatas adultas repletas fueron colectadas directamente de la piel del bovino y pesadas de forma individual ( $315 \pm 9$  mg). Se formaron dos grupos cada uno con 10 garrapatas. Las garrapatas se colocaron sobre una placa de vidrio adheridas de forma dorsal con cinta adhesiva de doble cara. La proteína de la cepa EC-35 se diluyó a una concentración de 10 µg/mL en agua destilada estéril. Las garrapatas del grupo tratado fueron inyectadas con 5 µL conteniendo 0.05 µg de proteína EC-35 usando una aguja de 31G X 6 mm. El grupo testigo se inyectó con 5 µL de agua destilada estéril. Las garrapatas se incubaron de la forma anteriormente descrita durante 14 días, pasado ese tiempo se determinó el porcentaje de control.

### **Análisis estadístico**

Los porcentajes de mortalidad de larvas y hembras adultas, así como la eclosión

de huevos fueron transformados ( $\log_n$ ) para obtener una distribución normal. Los valores de distribución obtenidos en el bioensayo de inmersión de larvas, alimentación capilar e inoculación en celoma fueron analizados mediante la prueba t-student, los valores del efecto del tiempo post exposición en larvas y la virulencia a diferentes concentraciones de proteína de la cepa EC-35 tanto en larvas como en hembras adultas repletas y sus parámetros reproductivos, se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 0.05. Se usó el programa estadístico SAS versión 6.0. La  $CL_{50}$  se calculó mediante análisis Probit usando el programa estadístico Polo Plus 2003 (Robertson *et al.*, 2003).

## RESULTADOS

### Prueba de Inmersión de Larvas

A las 24 horas post exposición de larvas de garrapatas *R. microplus* a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de proteína de la muestra EC-35, la tasa de mortalidad del grupo tratado con EC-35 fue mayor a la del grupo testigo con valor promedio de  $26.01 \pm 1\%$  y  $3.14 \pm 0.73\%$  respectivamente ( $p < 0.05$ ). La tasa de mortalidad después de 1, 2, 4 y 8 días de la exposición al tratamiento en las larvas desafiadas con la proteína de la cepa EC-35 fue similar ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, la mortalidad del grupo testigo aumentó en el día 4 y 8 ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 3.1). En los 4 tiempos evaluados, la tasa de mortalidad por EC-35 fue mayor que en el grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

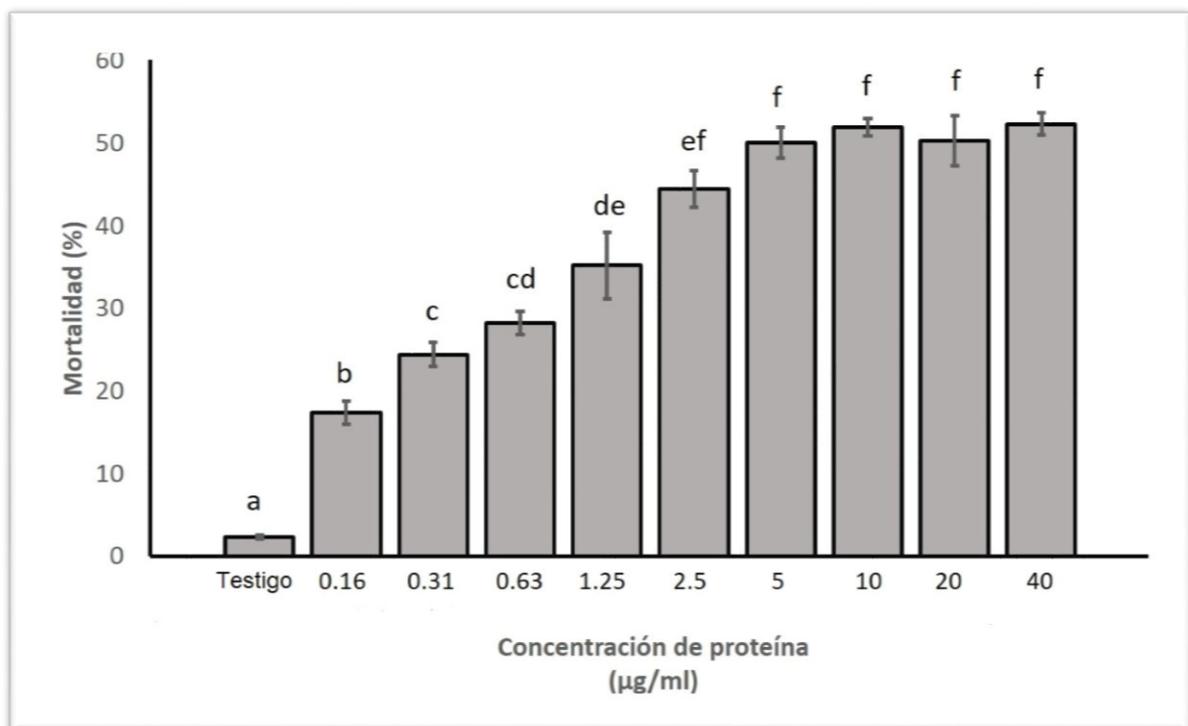
**Cuadro 3.1.** Tiempo de respuesta sobre la mortalidad de larvas de garrapatas *R. microplus*. Porcentaje de mortalidad en días posterior al desafío con 20  $\mu\text{g/mL}$  de proteína total de la bacteria EC-35. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar.

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 4	Día 8
<b>Testigo (%)</b>	$0.00 \pm 0.00^a$	$2.03 \pm 0.37^{ab}$	$3.02 \pm 0.63^b$	$9.63 \pm 1.09^c$
<b>EC-35 (%)</b>	$26.40 \pm 1.28^a$	$34.30 \pm 0.77^a$	$39.63 \pm 3.38^a$	$35.23 \pm 7.12^a$

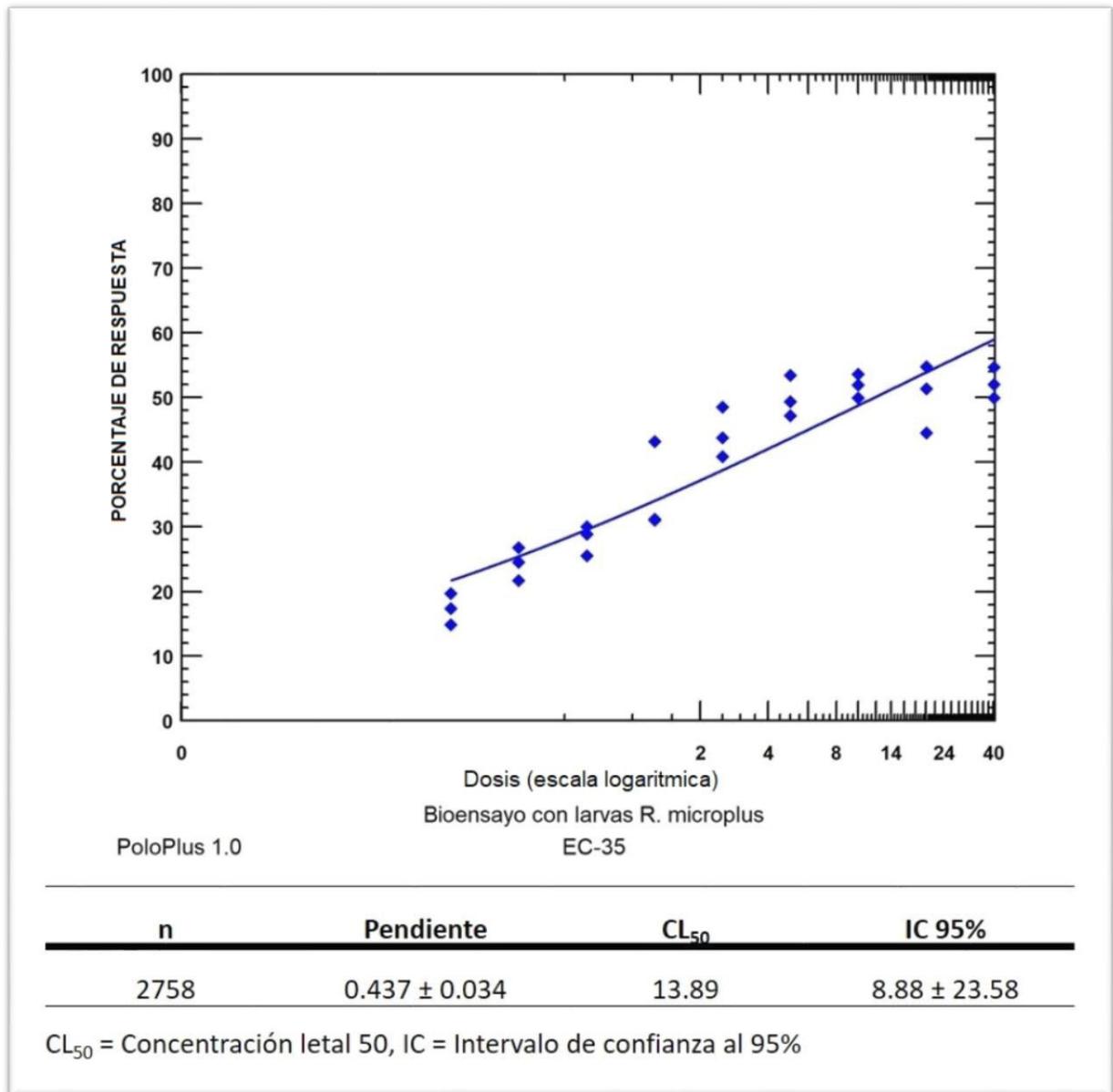
Diferente literal en la misma fila indica diferencias estadísticamente significativas, ANOVA ( $p < 0.05$ )

Las larvas de garrapatas expuestas a diferentes concentraciones de proteína total

de la muestra EC-35 mostraron diferencias en la tasa de mortalidad con respecto al grupo testigo ( $p < 0.05$ ). En el grupo expuesto a la concentración de proteína de  $0.16 \mu\text{g/mL}$  se observa la tasa de mortalidad más baja  $17.36 \pm 1.42\%$  mientras que en el grupo expuesto a la concentración de proteína de  $40 \mu\text{g/mL}$  se observa la tasa de mortalidad más alta con  $52.27 \pm 1.37\%$ . Al hacer una comparación entre los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de la cepa EC-35 ( $0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20$  y  $40 \mu\text{g/mL}$ ), se observan diferentes porcentajes de mortalidad entre los cuatro grupos expuestos a las dosis más bajas con mortalidad que va del  $17.6\%$  al  $35.19\%$ , no se observan diferencias significativas entre las cinco concentraciones de proteína más altas ( $p > 0.05$ ) (Figura 3.1). El análisis probit indica la  $CL_{50}$  a una concentración de  $13.89 \mu\text{g/ml}$  de proteína total de la muestra EC-35 (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Mortalidad de larvas de garrapata *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35. Las barras indican el porcentaje de mortalidad promedio  $\pm$  error estándar, diferente literal indica diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.2.** Valores del análisis Probit de larvas de garrapatas *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35.

### Prueba de Inmersión de Adultas

El peso promedio de los grupos de garrapatas hembras adultas repletas ( $n = 3$ ) empleados para este estudio fue de  $4.65 \pm 0.027$  g ( $p > 0.05$ ). El efecto de las diferentes concentraciones de proteína total de la cepa EC-35 en la oviposición medido como el peso de la masa de huevo y la eclosión se muestran en el cuadro 3.2.

**Cuadro 3.2.** Promedios ( $\pm$  EE; n = 3) de los parámetros reproductivos por grupo de garrapatas *R. microplus* hembras adultas repletas desafiadas a diferentes concentraciones de proteína total de bacteria EC-35.

<b>CPTB EC-35</b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Peso</b> <b>hembras (g)</b>	<b>Peso</b> <b>huevo (g)</b>	<b>Eclosión</b> <b>(%)</b>
<b>Testigo</b>	4.647 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.992 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	44.22 $\pm$ 4.16 <sup>a</sup>
<b>1.25</b>	4.659 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.213 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	51.82 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>
<b>2.5</b>	4.655 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.322 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>	52.55 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>
<b>5</b>	4.657 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.337 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	53.06 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>
<b>10</b>	4.652 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.979 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	42.40 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>
<b>20</b>	4.636 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.462 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	52.85 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>
<b>40</b>	4.667 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.158 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>	50.76 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>

CPTB EC-35 = Concentración de proteína total de bacteria EC-35. Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar, Coeficiente de variación 0.065, 11.49 y 2.84 % respectivamente. Diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas, Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

El efecto de los tratamientos sobre la tasa de mortalidad, la inhibición de la oviposición y porcentaje de control, se muestran en el Cuadro 3.3.

**Cuadro 3.3.** Promedios ( $\pm$  EE; n = 3) evaluación del efecto de diferentes concentraciones de proteína total de la bacteria EC-35 sobre los parámetros reproductivos en grupo de garrapatas *R. microplus* hembras adultas repletas.

<b>CPTB EC-35</b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Mortalidad</b> <b>(%)</b>	<b>Inhibición</b> <b>oviposición (%)</b>	<b>Control (%)</b>
<b>Testigo</b>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>1.25</b>	42.22 $\pm$ 4.45 <sup>b</sup>	39.36 $\pm$ 1.87 <sup>bc</sup>	28.12 $\pm$ 5.10 <sup>b</sup>
<b>2.5</b>	44.44 $\pm$ 9.70 <sup>b</sup>	33.73 $\pm$ 7.50 <sup>bc</sup>	20.28 $\pm$ 10.95 <sup>b</sup>
<b>5</b>	46.66 $\pm$ 10.20 <sup>b</sup>	33.06 $\pm$ 1.78 <sup>bc</sup>	18.64 $\pm$ 6.30 <sup>b</sup>

10	55.55 ± 8.02 <sup>b</sup>	50.93 ± 4.49 <sup>c</sup>	52.53 ± 5.46 <sup>b</sup>
20	33.33 ± 6.67 <sup>b</sup>	26.44 ± 6.38 <sup>b</sup>	9.34 ± 16.64 <sup>b</sup>
40	42.22 ± 5.89 <sup>b</sup>	42.25 ± 4.63 <sup>bc</sup>	30.61 ± 14.87 <sup>b</sup>

CPTB EC-35 = Concentración de proteína total de bacteria EC-35, IPR = Inhibición del potencial reproductivo. Se muestra el promedio ± error estándar, coeficiente de variación 8.91, 18.34 y 32.38 % respectivamente. Diferente letra en la misma columna significa diferencia estadísticamente significativa, Tukey (P<0.05).

### Prueba de Alimentación Capilar

El peso promedio de las garrapatas hembras adultas semi repletas (n = 10) empleados para este estudio fue de 33 ± 2 mg (p>0.05). El efecto de la muestra EC-35 a razón de 10 µg/mL de sangre administrada de forma artificial sobre los parámetros reproductivos de las garrapatas se muestra en el Cuadro 3.4.

**Cuadro 3.4.** Promedios (± EE; n = 10) de los parámetros reproductivos de hembras adultas *R. microplus* semi repletas alimentadas de forma artificial.

	PI	PF	NHO	PMH	Eclosión (%)
<b>Testigo</b>	31 ± 2 <sup>NS</sup>	65 ± 6 <sup>NS</sup>	10/10	16 ± 1 <sup>a</sup>	51.88 ± 3.86 <sup>a</sup>
<b>EC-35</b>	35 ± 3 <sup>NS</sup>	65 ± 6 <sup>NS</sup>	1/10	2 ± 2 <sup>b</sup>	5.47 ± 5.47 <sup>b</sup>

Parámetros evaluados en mg; PI = Peso inicial, PF = Peso final, NHO = Número de hembras que ovipositaron, PMH = Peso de la masa de huevo, NS = No significativa; diferente letra entre columnas indica diferencia significativa; t-student (p<0.05).

El efecto del tratamiento sobre los porcentajes en la tasa de mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje de control, se muestran en el Cuadro 3.5.

**Cuadro 3.5.** Promedios ( $\pm$  EE; n = 10) evaluación del efecto de la proteína de la cepa EC-35 sobre los parámetros reproductivos de garrapatas *R. microplus* alimentadas artificialmente

	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Inhibición oviposición (%)</b>	<b>Control (%)</b>
<b>Testigo</b>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>EC-35</b>	90 <sup>b</sup>	94.18 $\pm$ 10.13 <sup>b</sup>	92.90 $\pm$ 7.10 <sup>b</sup>

Diferente letra entre columnas indica diferencia significativa; t-student ( $p < 0.05$ ).

### Prueba de Inoculación en Celoma

El peso promedio de las garrapatas hembras adultas repletas (n = 10) empleadas para este estudio fue de 315  $\pm$  9 mg ( $p > 0.05$ ). El efecto de la inoculación de 0.05  $\mu$ g de proteína EC-35 por garrapata inoculada en el celoma, sobre los parámetros reproductivos de las garrapatas se muestra en el Cuadro 3.6.

**Cuadro 3.6.** Promedios ( $\pm$  EE; n = 10) de los parámetros reproductivos de hembras adultas repletas *R. microplus* inoculadas en el celoma con 0.05  $\mu$ g de proteína de la cepa EC-35.

	<b>Peso hembra (mg)</b>	<b>NHO</b>	<b>Masa huevo (mg)</b>	<b>Eclosión (%)</b>
<b>Testigo</b>	311 $\pm$ 11 <sup>NS</sup>	10/10	152 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	62.37 $\pm$ 8.66 <sup>a</sup>
<b>EC-35</b>	319 $\pm$ 5 <sup>NS</sup>	1/10	5 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	9.12 $\pm$ 9.12 <sup>b</sup>

NHO = Número de hembras con oviposición. NS = No significativa; diferente letra entre columnas indica diferencia significativa; t-student ( $p < 0.05$ ).

El efecto del tratamiento sobre los porcentajes en la tasa de mortalidad, inhibición de la oviposición y porcentaje de control, se muestran en el Cuadro 3.7.

**Cuadro 3.7.** Promedio ( $\pm$  EE; n = 10) evaluación del efecto de la proteína de la cepa EC-35 en los parámetros reproductivos individuales de garrapatas *Rhipicephalus microplus* inoculadas en el celoma

	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Inhibición oviposición (%)</b>	<b>Control (%)</b>
<b>Testigo</b>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>EC-35</b>	90 <sup>b</sup>	99.84 $\pm$ 6.14 <sup>b</sup>	96.98 $\pm$ 3.02 <sup>b</sup>

Diferente letra entre columnas indica diferencia significativa; t-student ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la cepa EC-35 de *S. marcescens*, es patógena a los estadios de larva y hembra adulta de garrapatas *R. microplus*. Las especies de *Serratia* secretan proteínas como toxinas formadoras de poro (Hertle, 2005), enzimas hidrolíticas (Veliz *et al.*, 2017) y biosurfactantes (Clements *et al.*, 2019). Estas secreciones conformadas por hemolisinas, quitinasas y lipopeptidos, podrían ser usadas como agentes de control contra garrapatas, ya que son enzimas las cuales podrían degradar el exoesqueleto el cual está compuesta principalmente de quitina y una capa delgada de lípidos (Hackman, 1982). Un método de control contra *R. microplus* usando las secreciones producidas por especies de *Serratia*, podría evitar efectos secundarios como la posibilidad de una patogénesis en bovinos tratados, debido al amplio rango de hospederos que tiene *Serratia* como artrópodos, humanos y animales. El efecto patógeno *in vitro* de la cepa EC-35 de *S. marcescens* contra larvas de garrapatas *R. microplus* se observó de forma significativa en los bioensayos realizados, usando como concentración inicial 20  $\mu\text{g/mL}$  de proteína de la cepa EC-35, esta concentración de proteína causó mortalidad del 26% en larvas de garrapatas a las 24 horas después del desafío. Al demostrar tener efecto patógeno, para verificar si el tiempo posterior al desafío con el tratamiento elevaba la tasa de mortalidad, se evaluó el tiempo de respuesta medido en diferentes días post tratamiento, encontrando la mortalidad más alta a los 4 días con un 39.63% sin que representara diferencias significativas con los conteos de mortalidad realizados a los días 1, 2, y 8. Las larvas de garrapatas *R. microplus* mantenidas bajo condiciones de laboratorio tienen una vida promedio de

60 días. Las larvas usadas para los bioensayos tenían de 30-40 días de edad. Al estar en una edad media, su sistema inmune podría haber ayudado a lidiar con una probable infección, y solamente las larvas débiles murieron en los primeros días después del desafío. La bacteria *S. marcescens* aislada de la esponja de mar *Haliclona amboinensis*, en su genoma, presenta genes que codifican para amilasas, lipasas y proteasas (Cheng *et al.*, 2018) estas enzimas pudieran ser las responsables de actuar en la degradación de macromoléculas presentes en la cutícula de las garrapatas, lo cual permitiría la penetración de la bacteria hacia el interior de las garrapatas.

Los bioensayos donde las larvas de garrapatas fueron desafiadas con diferentes dosis de proteína total de la bacteria EC-35, alcanzaron una mortalidad máxima del 52% a la concentración de 40 µg/mL de proteína total de bacteria EC-35 obteniéndose una CL<sub>50</sub> a la concentración de 13.9 µg/mL, una dosis relativamente baja comparada con aquella reportada para otros ácaros como *P. cuniculi* desafiado con proteína de la bacteria formadora de endoesporas *B. thuringiensis*, donde se reporta que es necesario 1.3 mg/ml de proteína total para matar al 50% de los ácaros (Dunstand-Guzmán *et al.*, 2015). Tanto en *R. microplus* como en *P. cuniculi* el máximo porcentaje de mortalidad rebasó ligeramente el 50% a pesar de usar concentraciones de proteína superiores a la CL<sub>50</sub>, mientras que en bioensayos con larvas de coleópteros del género *Phyllophaga* alimentados con dosis de 10<sup>8</sup> bacterias de *S. entomophila* alcanzaron tasas de mortalidad del 72% (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008); en larvas de lepidópteros alimentadas con hojas de col rociadas con un cultivo líquido total de *S. marcescens* se reporta una mortalidad del 91.7% (Jeong *et al.*, 2010), mientras larvas de *Plodia interpunctella* y *Ephestia kuehniella* alimentadas con esta misma especie de bacteria logran el 100% de mortalidad con dosis de 4x10<sup>6</sup> UFC/10 µl (Bidari *et al.*, 2017). Estas diferencias en las tasas de mortalidad provocadas por bacterias podrían deberse a que el desafío llevado a cabo en garrapatas es por baños de inmersión, donde la principal vía de contacto es a través de la cutícula, a diferencia de lo que ocurre con los coleópteros y lepidópteros en donde las bacterias son ingeridas, garantizando su penetración al interior del intestino. El amplio rango de susceptibilidad de las diferentes especies, nos indica que no debemos transpolar los resultados de una especie a otra, tampoco los datos obtenidos *in vitro* a condiciones *in vivo*.

La virulencia de otras cepas de *S. marcescens* ha sido asociada con actividad de proteasas como serralisina, quitinasas, gelatinasas y DNAsas; producción de sideroforos y actividad hemolítica (Pineda-Castellanos *et al.*, 2015; Raymann *et al.*, 2018; Méndez-Santiago *et al.*, 2020). Las hemolisinas producidas por *S. marcescens* son toxinas formadoras de poro conocidas como Sh1A y Sh1B, las cuales causan lisis de eritrocitos y de células eucariontes (Hertle 2005). La metaloproteasa serralisina se ha observado que permite a la bacteria suprimir la inmunidad celular del gusano de seda *Bombyx mori*, al reducir las propiedades adhesivas de los hemocitos en el artrópodo (Ishii *et al.*, 2014). Otras especies de *Serratia* también producen metaloproteasas, gelatinasas, proteasa alcalina y quitinasas (Matsumoto 2004; Pinna 2009; Kwak *et al.*, 2015). Una metaloproteasa de *S. grimesii* llamada grimelisina, es proteolítica para actina, al ser expresada en *E. coli* mostró capacidad para invadir células Hep-2, por lo que esta metaloproteasa podría permitir la invasión a células eucariontes (Bozhokina *et al.*, 2011). Los bioensayos de desafío con garrapatas adultas repletas, donde se emplearon concentraciones de proteína total de la bacteria EC-35 desde 1.25 µg/mL hasta 40 µg/ml en diluciones dobles seriadas, mediante la prueba de inmersión de adultas, alcanzó una tasa máxima de mortalidad del 55.5% usando una concentración de 10 µg/ml de proteína, una inhibición de la oviposición del 50.9% y un porcentaje de control del 52.5%. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el efecto causado por las diferentes concentraciones de proteína de la cepa EC-35. El valor máximo de mortalidad se alcanzó a la dosis de 10 µg/mL (55%), con valores más bajos hacia ambos lados de este pico (al igual que con inhibición de la oviposición y porcentaje de control). Este fenómeno llamado hormesis en forma de “U invertida”, describe la relación bifásica dosis – respuesta, la cual muestra estimulación a dosis bajas e inhibición a dosis altas (Calabrese y Baldwin, 2002). *S. marcescens* ha sido reportada como patógeno de la abeja *Apis mellifera* causando mortalidad del 40% al 60% al aplicarles en el cuerpo 10 µL de bacterias disueltas en PBS y sacarosa con una densidad óptica de 0.5 (Raymann *et al.*, 2018). Entre las bacterias usadas como bioinsecticidas, *B. thuringiensis* (*Bt*) es considerado el bioinsecticida más exitoso y también ha sido el más estudiado, ya que produce toxinas conocidas como Cry y Cyt las cuales al ser ingeridas forman poros en las células intestinales de larvas de artrópodos (Bravo *et al.*, 2011). El efecto de *Bt* sobre garrapatas blandas y duras ha sido reportado, en hembras

repletas de *Argas persicus* donde *B. thuringiensis kurstaki* causó una mortalidad del 100% a los 5 días de haber sido expuesta a una concentración de 1 mg/mL de proteína total; *B. thuringiensis israelensis* provocó el 100% de mortalidad a una dosis de 2.5 mg/mL; *B. thuringiensis thuringiensis* en una concentración de 5 mg/mL indujo un 93.3% de mortalidad; sin embargo, con *H. dromedarii*, se alcanzaron mortalidades del 93%, 86% y 73% cada cepa de *Bt* usando una dosis más alta de 10 mg/mL (Hassanain *et al.*, 1997). Otro reporte indica que esporas de *B. thuringiensis kurstaki* fueron tóxicas hacia larvas repletas de *I. scapularis* obteniéndose una  $CL_{50}$  con  $10^7$  esporas (Zhioua *et al.*, 1999). En garrapatas *Ornithodoros erraticus* alimentadas de forma artificial con una mezcla de esporas de *Bt* y sangre se alcanzó un 100% de mortalidad (Samish *et al.*, 1999). En baños de inmersión, cepas de *Bt* alcanzaron hasta un 80% de mortalidad sobre *R. microplus* hembras adultas repletas a una dosis de 1.25 mg/mL a los 15 días después del desafío (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2010), así como también una cepa que sobre expresa una proteína de la capa-S mató al 75% de las hembras repletas con 300  $\mu$ g/mL y alcanzó más del 90% de inhibición de la eclosión con 100  $\mu$ g/mL (Lormendez *et al.*, 2019). Las diferencias entre el efecto letal hacia *R. microplus* de bacterias como *Bt* comparada con *S. marcescens* podría deberse a que esta última está catalogada como patógeno oportunista (Mahlen 2011), es decir, se vuelve patógeno cuando hay debilidad del sistema inmune del organismo hospedador, inclusive logra evadir su acción al no inducir la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, ni enzimas como fenol oxidasa (Raymann *et al.*, 2018) que actúan como parte del sistema inmune innato de defensa a la invasión de patógenos en invertebrados.

La dosis de 10  $\mu$ g/mL de proteína total mostró el valor máximo de mortalidad 55.5 %, una inhibición de la oviposición del 50.9% y un porcentaje de control del 52.5% en la prueba de inmersión de hembras adultas, al usar esta misma dosis en la prueba de alimentación capilar se alcanzó el 90%, 94.2% y 92.9% hacia las mismas variables. Las diferencias observadas entre pruebas, podrían deberse a la vía de entrada de la bacteria hacia el interior de la garrapata, mientras que en la prueba de inmersión lo hace a través de cutícula y orificios naturales lo cual minimizaría la dosis entrante, en la prueba de alimentación capilar lo hace a través de las células intestinales, facilitando la secreción de proteínas tóxicas directamente en células.

Esto difiere de lo reportado en abejas alimentadas con polen mezclado con diferentes cepas de *S. marcescens* a una densidad óptica de 1 en donde la mortalidad fue de un rango de entre 10% al 20% (Raymann *et al.*, 2018); sin embargo, los datos en la tasa de mortalidad se asemejan con los resultados obtenidos por otros autores en donde observaron mortalidades del 70% al 100% en coleópteros y lepidópteros a los cuales les administraron alimento contaminado con bacterias de *Serratia* (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2010; Bidari *et al.*, 2017). El aumento en la tasa de mortalidad de las garrapatas alimentadas con sangre y proteína total de EC-35 con respecto a lo observado en la prueba de inmersión, podría deberse a la penetración directa de bacterias hacia el intestino donde un mayor número de bacterias logran penetrar y secretar sus proteínas tóxicas directamente en las células del sistema digestivo.

La concentración de 0.05 µg de proteína total de EC-35 empleada para inocular a cada garrapata en el celoma, alcanzó el 90% de mortalidad, 99.8% de inhibición de la oviposición y un 96.9% de control. La mortalidad es similar a lo reportada en abejas inoculadas con 10 células de diferentes cepas de *S. marcescens* donde alcanzaron una mortalidad del 100% (Raymann *et al.*, 2018) mismo resultado fue obtenido con coleópteros y lepidópteros inoculados con 30 µg de proteína por larva de *S. entomophila* (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008). La alta mortalidad causada por *Serratia*, podría ser ocasionada por las hemolisinas secretadas directamente en la hemolinfa de las garrapatas las cuales podrían causar lisis de los hemocitos.

A pesar del problema que *R. microplus* representa para la industria ganadera, son muy pocos los estudios de control biológico. En este trabajo, se describe el efecto patógeno de *S. marcescens* en garrapatas larvas y hembras repletas por primera vez. El análisis de los metabolitos producidos y sus efectos, son necesarios para identificar los posibles mecanismos de acción en garrapatas. Se requieren más estudios sobre agentes de control biológico contra *R. microplus*, los cuales podrían ser usados en programas de control integrado.

## CONCLUSIÓN

La muestra de bacterias EC-35 de *S. marcescens* aislada de una garrapata muerta es patógena a garrapatas larvas y hembras adultas *R. microplus* bajo condiciones

*in vitro*.

## REFERENCIAS

Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J (2010) Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology research*, 106(2), 471–479.

Bidari F, Shams-Bakhsh M, Mehrabadi M (2017) Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). *J Appl Entomol.* 1-11.

Bozhokina ES, Tsaplina OA, Efremova TN, Keвер LV, Demidyuk IV, Kostrov SV, Adam T, Komissarchik YY, Khaitlina SY (2011) Bacterial invasion of eukariotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimelysin and protealysin. *Cell Biol Int.* 35(2), 111-118.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros E, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12), 4965-4972.

Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21:91-97

Cheng T, Saidin J, Danish-Daniel M, Gan H, Mat Isa M, Abu Bakar M, Ismail N, (2018) Genome sequence of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* strain K27, a marine bacterium isolated from sponge (*Haliclona amboinensis*). *Genome Announc.* 6 (6), 1-2.

Clements T, Ndlovu T, Khan S, Khan W (2019) Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(2):589-602.

Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory test of insecticides. J Econ Entomol 66(1):130-133.

Dunstand-Guzmán E, Peña-Chora G, Hallal-Calleros C, Pérez-Martínez M, Hernández-Velazquez VM, Morales-Montor J, Flores-Pérez FI (2015) Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*. Parasit Vectors 8:285.

Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Romo-Martínez A, Hernández-Velázquez V, Bravo A, Pérez D (2010) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. J Insect Sci 10(186):1-6.

Gonsioroski AV, Bezerra IA, Utiumi KU, Driemeier D, Farias SE, da Silva Vaz Jr I, Masuda A (2012) Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillar feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. Experimental Parasitology 130:359-363.

Hackman RH (1982) Structure and function in tick cuticle. Ann. Rev. Entomol. 27:75-95

Hassanainm MA, El Garhy FM, Abdel-Ghaffar AF, El-Sharaby A, Abdel Megeed NK (1997) Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae). Parasitol Res 83:209-213.

Hertle R (2005) The family of *Serratia* type pore forming toxins. Curr Protein Pept Sci 6:313-325.

Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014) *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. J Biol Chem 289(9):5876-5888.

Jeong H, Mun H, Oh H, Kim S, Yang H, Kim I, Lee H (2010) Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia sp.* EML-SE1 against diamondback moth. J Microbiol 48(4):541-545.

Johnson VW, Pearson JF, Jackson TA (2001) Formulation of *Serratia entomophila* for biological control of grass grub. *Pasture Weeds & Pest. N. Z. and Plant Prot.* 54:125-127.

Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS (2006) Larval immersion test with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 142:386-390.

Kwak Y, Khan AR, Shin JH (2015) Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. *J Biotechnol* 193:1-2.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132:1-41.

Lormendez C, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez V, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramirez G, Lina-Garcia L, Peña-Chora G (2019) Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Scientific Reports.* 9:17586.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to ocurrent practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4):755-791.

Matsumoto K (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* 385:1007-1016.

McQuade R, Stock SP (2018) Secretion systems and secreted proteins in Gram-negative entomopathogenic bacteria: their roles in insect virulence and Beyond. *Insects.* 9:68.

Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol L, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villareal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203: 549 – 559.

- Nuñez-Valdez ME, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, Gutierrez M del C, Villalobos FJ (2008) Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl Environ Microbiol* 74(3):802-810.
- Pineda-Castellanos ML, Rodríguez-Segura Z, Villalobos FJ, Hernández L, Lina L, Nuñez-Valdez ME (2015) Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* toward larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). *Pathogens* 4:210-228.
- Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S (2009) Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* 89(4):382-387.
- Raymann K, Coon K, Shaffer Z, Salisbury S, Moran N (2018) Pathogenicity of *Serratia marcescens* strain in honey bees. *mBio* 9(5): e01649-18.
- Romo-Martínez A, Fernández-Ruvalcaba M, Hernández-Velázquez VM, Peña-Chora G, Lina-García LP, Osorio-Miranda J (2013) Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Res. J. Agric. Sci. Rev.* 2(3):64-79.
- Samish M, Rehacek J (1999) Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* 44:159-182.
- Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56:1267-1274.
- Townsend RJ, Ferguson CM, Proffitt JR, Slay MWA, Swaminathan J, Day S, Gerard E, Callaghan MO, Johnson VW, Jackson TA (2004) Establishment of *Serratia entomophila* after application of a new formulation for grass grub control. *Insect in Pasture. N. Z. and Plant Prot.* 57:310-313.
- Vega FE, Kaya HK (2012) Insect pathology, Second edition, Chapter 1: Scope and basic principles of insect pathology. Academic Press, 1-12.
- Veliz E, Martinez-Hidalgo P, Hirsch AM (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology* 3(3):689-705.

Zhioua E, Heyer H, Browning M, Ginsberg HS, LeBrun RA (1999) Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *Kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 36(6): 900-902.

## Capítulo 4

### **Análisis de la histoarquitectura de garrapatas *Rhipicephalus microplus* afectadas por la bacteria patógena.**

#### **RESUMEN**

La bacteria *Serratia marcescens* es un patógeno que produce diferentes metabolitos, es altamente tóxica para los hemocitos y células epiteliales del intestino de artrópodos, sin embargo, se desconoce su efecto sobre garrapatas *R. microplus*. El objetivo de este estudio fue: analizar la histoarquitectura de garrapatas *Rhipicephalus microplus* afectadas por la bacteria patógena. Las garrapatas en estadio de larvas y hembras adultas repletas fueron divididas en tres grupos experimentales; El grupo 1 fue el testigo sin tratamiento, el grupo 2 fue desafiado con el garrapaticida Coumafós y el grupo 3 fue desafiado con la bacteria patógena *Serratia marcescens* cepa EC-35. Las garrapatas del grupo testigo y aquellas afectadas por el ixodicida y la cepa patógena fueron fijadas en formalina al 10%, posteriormente deshidratadas y aclaradas en alcoholes a diferente concentración para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes a 5  $\mu\text{m}$  para larvas y 10  $\mu\text{m}$  para garrapatas adultas, los cuales se tiñeron con hematoxilina – eosina y se foto documentaron. El análisis se realizó utilizando el software Motic Images Plus 3.0. Los parámetros evaluados para larvas fueron: perímetro y área en la larva completa y grosor de la cutícula; para hembras adultas se evaluó únicamente el grosor de la cutícula. Las mediciones realizadas tanto en larvas como en hembras adultas repletas expuestas a los tres tratamientos, se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 0.05. Las larvas de garrapatas afectadas por la cepa EC-35 y el Coumafós no mostraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el perímetro y área del cuerpo con respecto al grupo testigo. En larvas hubo diferencias ( $p < 0.05$ ) en el promedio del grosor del exoesqueleto de los grupos desafiados con los ixodicidas EC-35 ( $6.01 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ) y Coumafós ( $12.04 \pm 1.2 \mu\text{m}$ ) con respecto al grupo testigo ( $17.06 \pm 2 \mu\text{m}$ ). El exoesqueleto de las garrapatas hembras adultas afectadas por la cepa EC-35 y el Coumafós tuvieron un grosor de  $27.48 \pm 1.71 \mu\text{m}$  y  $29.29 \pm 1.41 \mu\text{m}$  respectivamente el cual es menor al grosor del grupo testigo ( $30.82 \pm 0.54 \mu\text{m}$ ); sin embargo, no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ )

entre promedios. Se observó que la cepa patógena EC-35 de *Serratia marcescens* adelgaza el exoesqueleto y causa pérdida de la histoarquitectura al tejido de *R. microplus*, posiblemente asociada con la secreción de diversos factores de virulencia como: proteasas, quitinasas, hemolisinas, lipopolisacaridos y formación de fimbrias. La cepa de bacterias EC-35 de *Serratia marcescens* patógena a garrapatas degradó la cutícula en larvas y causo pérdida de histoarquitectura tanto en larvas como en garrapatas hembras adultas *R. microplus*.

## INTRODUCCIÓN

La bacteria *Serratia marcescens* es un patógeno que produce diferentes metabolitos los cuales han sido asociados al biocontrol (Soenens e Imperial, 2020), se sabe que es altamente tóxica para los hemocitos y células epiteliales del intestino de artrópodos (Petersen y Tisa, 2013). Los factores de virulencia de *S. marcescens* han asociado con la secreción de proteasas, quitinasas, hemolisinas, lipopolisacaridos y formación de fimbrias (Mahlen, 2011; Pineda-Castellanos *et al.*, 2015; Raymann *et al.*, 2018; Méndez-Santiago *et al.*, 2021).

En general existen pocos estudios en artrópodos que describan los daños provocados por *S. marcescens* en organismos afectados; Aggarwal *et al.* (2017) demostraron de forma *in vitro* la colonización y daños en intestinos causados por esta bacteria a *Spodoptera litura*; otros autores han señalado que actúa evitando el cierre de heridas provocando una pérdida de hemolinfa (Ishii *et al.*, 2014 a, b). Debido a la escasa información existente y dado que, a la fecha, no existen reportes de estudios relacionados con el daño provocado directamente por *Serratia sp.* en garrapatas *R. microplus* afectadas por esta bacteria, que ayuden a explicar el mecanismo de acción que emplean para causar la muerte del ixodido; en el presente trabajo se planteó que una vez que fue seleccionada, identificada y evaluada una cepa de bacteria patógena a garrapatas *R. microplus*, el siguiente paso consistió en analizar el daño causado por la bacteria a la garrapata, por lo que el objetivo de este estudio fue: analizar la histoarquitectura de garrapatas *R. microplus* afectadas por la bacteria patógena *S. marcescens*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de garrapatas

La cepa de *R. microplus* Media Joya usada en este estudio, posee la característica de susceptibilidad a ixodicidas y es mantenida mediante infestaciones artificiales en bovinos dentro de las instalaciones del CENID-SAI del INIFAP en Jiutepec, Mor. Para obtener garrapatas hembras repletas, un bovino raza Holstein-Friesian de 120 kg de peso, fue infestado con 10,000 garrapatas en estadio de larva para desarrollar la fase de vida parasitaria. Veintiún días después de la infestación, se colectaron directamente de la piel del bovino garrapatas repletas las cuales se usaron en los bioensayos y en la obtención de huevos y posteriormente larvas.

### Diseño experimental

Se formaron tres grupos de garrapatas en estadio de larva y hembra adulta repleta con tres repeticiones cada uno. El grupo 1 testigo fue desafiado con Tween 20<sup>®</sup> al 1%, el grupo 2 fue desafiado con el garrapaticida comercial Asuntol<sup>®</sup> teniendo como principio activo el Coumafos, empleando la concentración comercial recomendada por el laboratorio productor 0.02% y el grupo 3 fue desafiado con la bacteria patógena cepa EC-35 a una concentración de 10 µg/mL de proteína total. Se emplearon de 80-120 larvas y 10 garrapatas adultas por repetición.

Los desafíos se realizaron mediante pruebas de inmersión para ambos estadios larvas y garrapatas adultas. Para larvas, el desafío se realizó con larvas sin alimentar a una edad de 30-40 días. En un tubo para micro centrifuga de 1.5 mL se agregó la solución de acuerdo al grupo asignado, en un volumen final de 1 mL. Para cada grupo se realizó la inmersión de 300 larvas durante 10 minutos, al finalizar las larvas fueron colocadas en paquetes de papel filtro e incubadas durante 24 horas a  $27 \pm 2$  °C con una humedad relativa superior al 80%, pasado ese tiempo se colectaron las larvas afectadas. Para el desafío con hembras adultas se formaron 3 grupos de 10 garrapatas cada uno, los grupos fueron bañados en vasos de precipitado a razón de 1 mL de solución por cada garrapata, se sumergieron durante 10 minutos, se eliminó el exceso de líquido colocándolas sobre papel toalla y posteriormente se colocaron de manera individual en placas de polietileno (Cell Wells, Corning Glass Works) de 24 pozos incubándose de la forma anteriormente

descrita. Todos los desafíos se hicieron por triplicado.

## **Procesamiento de tejido**

### **Fijación**

Después de 24 h, se colectaron las larvas afectadas en los paquetes de papel filtro, las cuales fueron procesadas siguiendo el método descrito por Prophet *et al.* (1995); donde las larvas fueron colocadas en una solución de formalina al 10% neutra y estabilizada y se mantuvieron a 4 °C.

Las garrapatas adultas de los grupos 2 y 3 después del desafío, fueron revisadas diariamente hasta su muerte; se tomó como criterio de mortalidad la falta de movimientos intestinales, ausencia de movimiento en apéndices, así como adquirir una coloración negra; las garrapatas del grupo testigo vivas y las garrapatas muertas de los grupos 2 y 3 fueron fijadas en formalina de la forma anteriormente descrita.

### **Deshidratación y aclaramiento**

Larvas y garrapatas adultas fueron sometidas a un proceso de deshidratación y aclaramiento de tejidos mediante pases seriados en soluciones de alcohol al 5%, 10%, 20%, 35%, 40%, 70%, 85%, 95% y un paso final en alcohol absoluto; una hora en cada solución. Posteriormente las garrapatas deshidratadas fueron infiltradas en parafina a 60 °C durante nueve horas con cambios de parafina cada tres horas. Posterior a la infiltración se incluyeron en moldes de plástico para sostener el tejido durante el corte. Cinco garrapatas adultas seleccionadas al azar de cada grupo fueron utilizadas para realizar los cortes histológicos.

### **Microtomía**

Las garrapatas incluidas en parafina fueron seccionadas usando cuchillas desechables de bajo perfil. Previo al corte, las garrapatas fueron sumergidas en una solución alcalina de KOH al 10%. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor para larvas y 10 µm para garrapatas adultas. Por cada garrapata adulta se realizaron 10 cortes. Los cortes fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con albumina de Mayer como adherente.

## **Tinción hematoxilina - eosina**

Los cortes se bañaron en xilol y en etanol a concentraciones de absoluto, 95% y 80%, posteriormente se sumergieron en hematoxilina durante tres minutos, los cortes se lavaron en agua corriente, después fueron bañados de forma seriada en alcohol acido, carbonato de litio, alcohol al 96%, eosina, etanol absoluto y un paso final en xilol.

Los cortes teñidos fueron montados con una resina sintética (Entellan®) y observados en un microscopio compuesto Motic BA410E con los objetivos de 10x y 40x Los cortes se foto documentaron utilizando la cámara Moticom 2000 2.0M®. El análisis se realizó utilizando el software Motic Images Plus 3.0. Los parámetros evaluados en larvas fueron: perímetro y área en la larva completa, grosor de la cutícula e identificación de tipos celulares; para hembras adultas se evaluó únicamente el grosor de la cutícula.

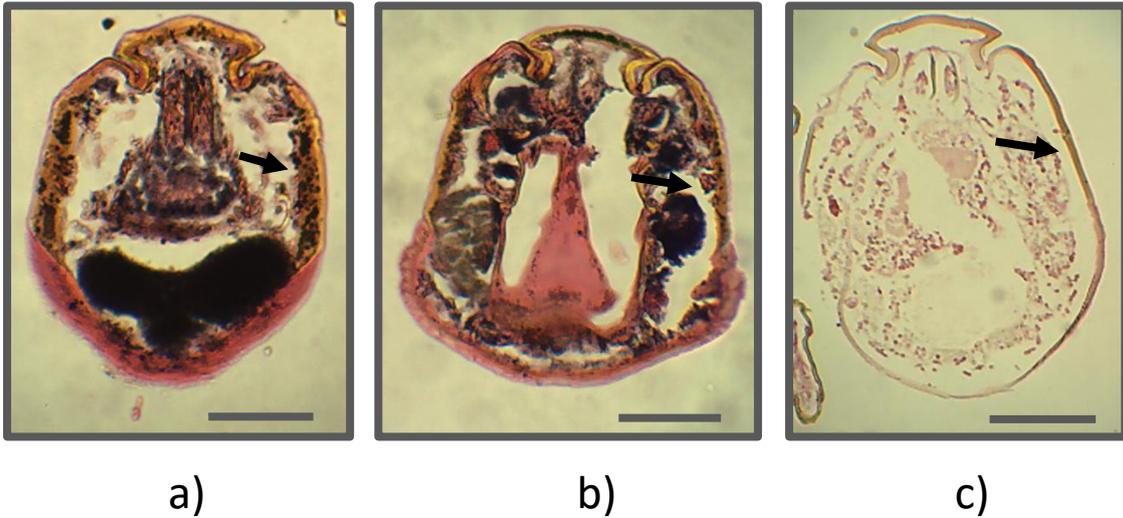
## **Análisis estadístico**

Los valores de las mediciones realizadas tanto en larvas como en hembras adultas repletas expuestas a los tres tratamientos, se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 0.05. Se usó el programa estadístico SAS versión 6.0.

# **RESULTADOS**

## **Análisis de larvas**

Las larvas de garrapatas (Figura 4.1) afectadas por la cepa EC-35 de *S. marcescens* y el coumafos no mostraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el perímetro y área del cuerpo con respecto al grupo testigo (Cuadro 4.1). Sin embargo, hubo diferencias ( $p < 0.05$ ) en el promedio del grosor del exoesqueleto de los grupos desafiados con los ixodicidas EC-35 ( $6.01 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ) y coumafos ( $12.04 \pm 1.2 \mu\text{m}$ ) con respecto al grupo testigo ( $17.06 \pm 2 \mu\text{m}$ ) (Figura 4.2 y 4.3). Se observó la presencia de islas de células con núcleo en los grupos tratados con Coumafos y el testigo, pero ausencia de estas en el grupo tratado con EC-35 (Figura 4.4).



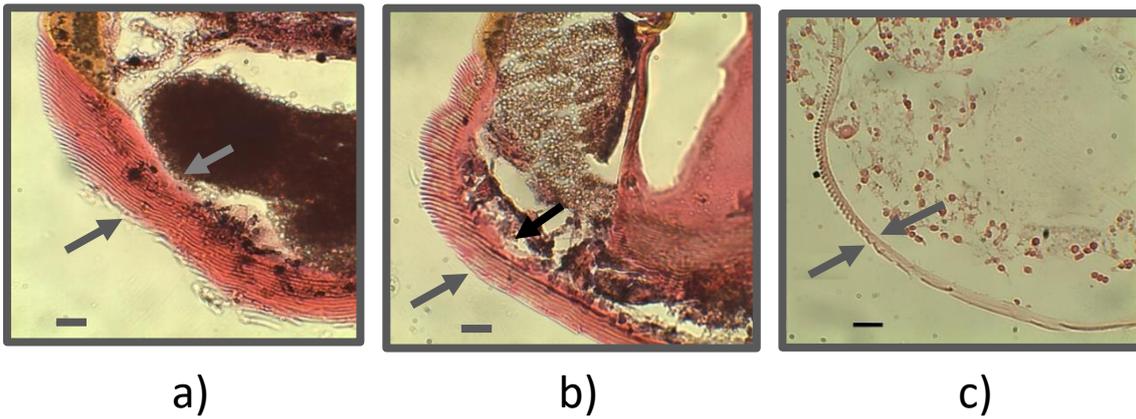
**Figura 4.1.** Cortes histológicos de larvas completas de garrapatas *R. microplus* teñidos con hematoxilina – eosina. x100. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafos c) EC-35. Las flechas señalan el exoesqueleto. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

**Cuadro 4.1.** Promedio ( $\pm$  EE; n = 10) Comparación del efecto de dos ixodicidas sobre la morfología de larvas de garrapata *R. microplus*

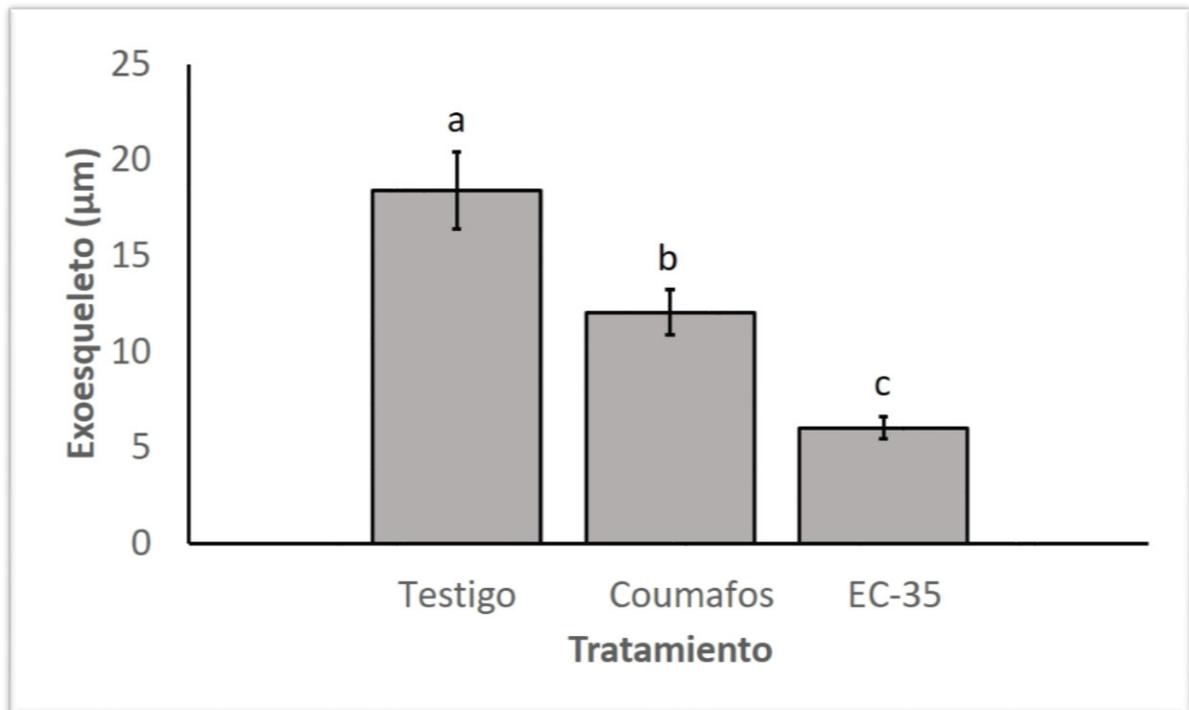
Tratamiento	Perímetro $\mu\text{m}$	Área $\mu\text{m}^2$
<b>Testigo</b>	1040.5 $\pm$ 61.2 <sup>a</sup>	67398 $\pm$ 7899.7 <sup>a</sup>
<b>Coumafos</b>	951.1 $\pm$ 59.4 <sup>a</sup>	63005 $\pm$ 7798.6 <sup>a</sup>
<b>EC-35</b>	949.6 $\pm$ 37.5 <sup>a</sup>	61747 $\pm$ 4194.4 <sup>a</sup>

Misma literal entre columnas indica diferencia no significativa, ANOVA ( $p > 0.05$ ).

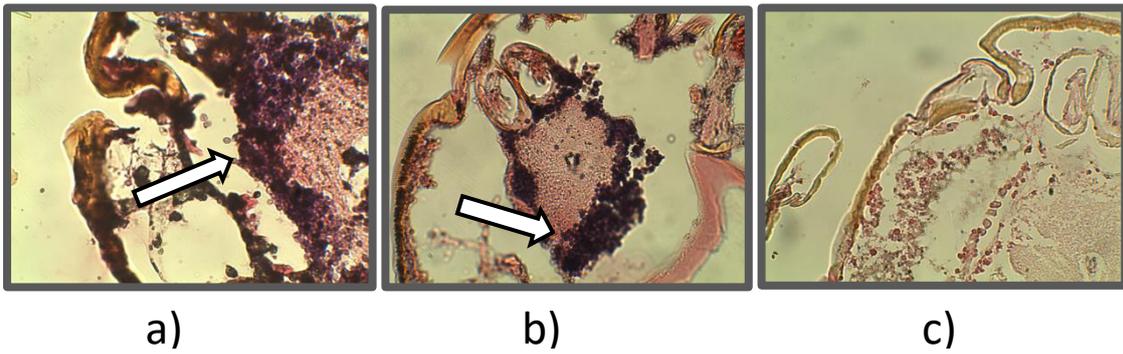
Coefficientes de variación 17.34 y 33.80% respectivamente.



**Figura 4.2.** Zona caudal del exoesqueleto de larvas de garrapatas *R. microplus* teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafós, c) EC-35. Las flechas señalan una de las zonas medidas. Barra 10  $\mu\text{m}$ .



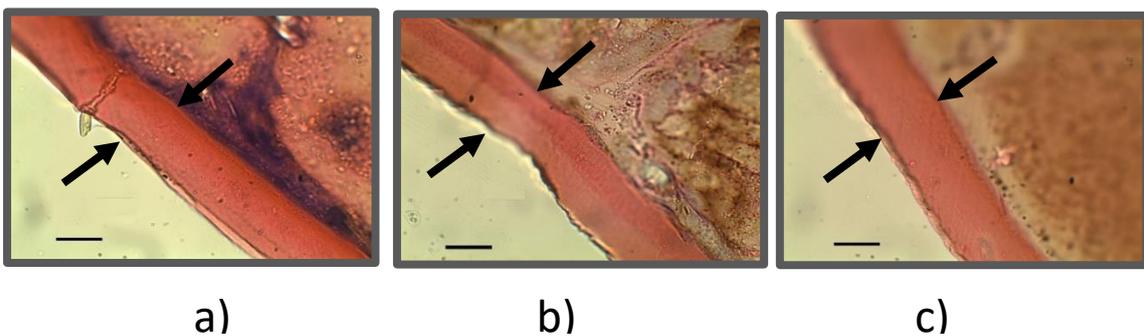
**Figura 4.3.** Efecto de dos ixodicidas sobre el exoesqueleto de larvas de garrapatas *R. microplus*, las barras indican el grosor promedio del exoesqueleto  $\pm$  error estándar, coeficiente de variación 35.9%, diferente literal indica diferencia significativa; Tukey ( $p < 0.05$ ).



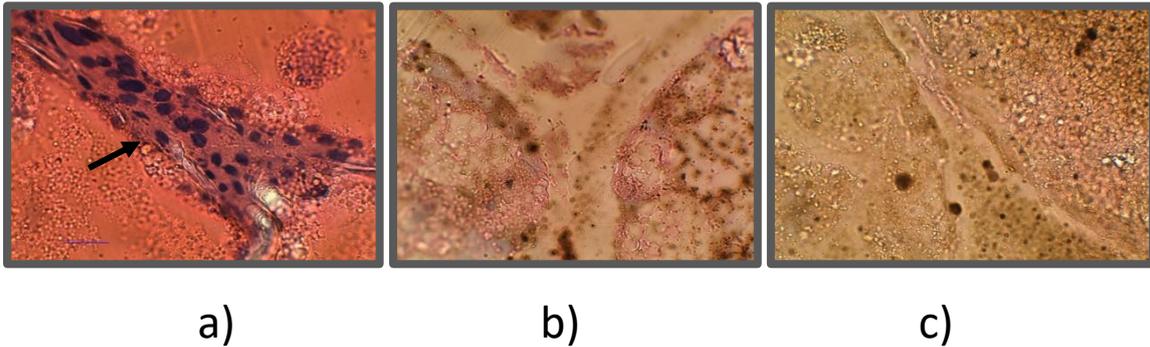
**Figura 4.4.** Islas de células nucleadas alrededor del estómago de larvas de garrapatas *R. microplus* teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafos, c) EC-35.

### **Análisis de hembras adultas**

El exoesqueleto de las garrapatas adultas afectadas por la cepa EC-35 de *S. marcescens* y el Coumafos tuvieron un grosor de cutícula de  $27.48 \pm 1.71 \mu\text{m}$  y  $29.29 \pm 1.41 \mu\text{m}$  respectivamente lo cual es menor al grosor del grupo testigo ( $30.82 \pm 0.54 \mu\text{m}$ ); sin embargo, no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre promedios (Figura 4.5). También se observó la presencia de núcleos en los canales de hemolinfa de las garrapatas del grupo testigo y ausencia de estos, en las garrapatas afectadas por el Coumafos y la cepa EC-35 de *S. marcescens* (Figura 4.6).



**Figura 4.5.** Exoesqueleto de garrapatas adultas *R. microplus* teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafos c) EC-35. Las flechas señalan una de las zonas medidas. Barra 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.6.** Núcleos en canal de hemolinfa de garrapatas adultas *R. microplus* teñidos con hematoxilina – eosina. x400. Tratamientos: a) Testigo, b) Coumafos c) EC-35.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que la cepa patógena EC-35 de *S. marcescens* adelgaza el exoesqueleto de larvas y causa pérdida de la histoarquitectura al tejido de *R. microplus*. Las bacterias del género *Serratia* han mostrado ser patógenos de varios artrópodos de las familias Coleóptera, Himenóptera, Lepidóptera y Díptera en donde su patogenicidad ha sido asociada con la secreción de proteasas, quitinasas, hemolisinas, lipopolisacaridos y formación de fimbrias; siendo altamente tóxica para los hemocitos y células epiteliales del intestino de insectos (Grimont y Grimont, 1978; Mahlen, 2011; Patil *et al.*, 2012, Petersen y Tisa, 2013; Pineda-Castellanos *et al.*, 2015; Raymann *et al.*, 2018; Soenesn *et al.*, 2020). Al analizar el perímetro y el área de las larvas de garrapatas *R. microplus* afectadas después de su exposición tanto al ixodicida químico Coumafos como con la cepa EC-35, se aprecia una reducción en ambos grupos; sin embargo, este no resultó ser estadísticamente significativo con respecto al grupo testigo. El integumento o exoesqueleto de las garrapatas tiene en su parte más externa a la cutícula, se asume que en larvas funciona como la encargada del intercambio gaseoso y vapor de agua; el movimiento de agua a través de la cutícula es regulado por células epidérmicas secretoras en un proceso activo (Hackman 1982). El ligero encogimiento de las larvas afectadas por los ixodicidas, podría deberse a la pérdida de agua ocasionada por la ausencia de actividad celular después de producirse la muerte.

Los tratamientos con Coumafos y EC-35 usados a las concentraciones de 0.02% y 10 µg/mL respectivamente, tuvieron efecto sobre el exoesqueleto de las larvas de

garrapatas *R. microplus*, según lo observado en los cortes histológicos visualizados a x400, en donde se aprecia un adelgazamiento del exoesqueleto en ambos tratamientos al ser comparados con el grupo testigo. El Coumafos es un organofosforado; su toxicidad se atribuye a la capacidad para inhibir acetilcolinesterasa (AChE, colina hidrolasa, EC 3.1.1.7) una enzima que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh); el cual regula la función del sistema nervioso central, esta inhibición provoca la acumulación del neurotransmisor en una sinapsis nerviosa o unión neuromuscular generando fallas en la respiración, parálisis y muerte (Fukuto 1990). El efecto mostrado en el exoesqueleto pudiera ser causado por el vehículo empleado en la formulación comercial para hacer que la sal ixodicida sea soluble en agua. El exoesqueleto de las garrapatas está formado por la cutícula, epidermis y glándulas dérmicas; a su vez la cutícula se conforma por  $\alpha$ -quitina, proteína y una capa de lípidos (Hackman 1982). El adelgazamiento del exoesqueleto de larvas de garrapatas *R. microplus* producido por la cepa EC-35 podría deberse a que *S. marcescens* es una bacteria productora de quitinasas las cuales han reportado ser de gran importancia en bacterias con potencial para uso en biocontrol, particularmente las quitinasas pertenecientes a la familia 18 (Veliz *et al.*, 2017); la expresión de las quitinasas recombinantes ChiA, ChiB y ChiC de *S. marcescens* cepa GEI fueron patógenas para el ácaro *Varroa destructor* mostrando sinergismo al ser mezcladas entre sí en concentraciones de 34.8 y 27.5 U/mL, alcanzando mortalidades mayores al 90% en condiciones *in vitro* (Tu *et al.*, 2010). En el caso de las hembras adultas, también mostraron un ligero adelgazamiento sin que este fuera estadísticamente significativo con respecto al testigo. En el caso del exoesqueleto de las garrapatas adultas expuestas a EC-35 el no haber mostrado un adelgazamiento tan evidente como fue con las larvas, podría deberse a que las garrapatas ya estaban alimentadas y la bacteria utilizó como sustrato la sangre ingerida por la garrapata la cual es una fuente rica en proteína, en lugar de usar el carbohidrato del exoesqueleto que es el principal componente, como sucedió con las larvas.

Los daños causados a las larvas de *R. microplus* por EC-35 de *S. marcescens* provocó que no se observaran islas de células nucleadas, como si ocurrió en aquellas afectadas por el Coumafos y en el testigo; observándose una pérdida drástica de la histoarquitectura. *Serratia marcescens* es una bacteria secretora de

las hemolisinas *Sh1A* y *Sh1B* y citolisinas, las cuales son toxinas formadoras de poros en la membrana plasmática de células eucariontes, estas toxinas son consideradas como uno de los principales factores de patogenicidad además de fimbrias, proteasas, lipasas y nucleasas (Hertle 2005). La membrana peritrófica del intestino de larvas de *Spodoptera litura* incubadas con cepas de diferente virulencia de *S. marcescens* mostro daños en los sitios de densa colonización con la cepa más virulenta, señalando a estos daños como la posible vía de entrada hacia la hemolinfa (Aggarwal *et al.*, 2017). Otro factor de virulencia de *S. marcescens* señalado por su toxicidad hacia artrópodos es la metaloproteasa serralisina (Pineda-Castellanos *et al.*, 2015), la cual se cree actúa sobre su sistema inmune disminuyendo la adhesividad de hemocitos e inhibiendo la cicatrización de heridas generando pérdida de hemolinfa (Ishii *et al.*, 2014 a, b). Estos factores de virulencia, podrían ser los responsables de la patogenicidad de esta cepa de *S. marcescens* hacia las larvas de garrapata. En el caso de las hembras adultas repletas, se observó ausencia de núcleos en los canales de hemolinfa de las garrapatas tratadas con el Coumafos y EC-35 los cuales claramente se aprecian en el grupo testigo. El Coumafos como se mencionó anteriormente afecta a nivel de sistema nervioso central y *Serratia* a nivel de sistema inmune, sin embargo, el observar el mismo daño tisular en ambos grupos, podría deberse a que el rango de tiempo post desafío fue mayor al empleado en larvas y el tejido fue fijado una vez que las garrapatas mostraron una coloración negra como signo de muerte, donde existe la posibilidad que diferentes enzimas proteolíticas hubieran actuado, se procedió de esta forma debido a la complejidad para determinar el momento exacto en el cual se produce la muerte de la garrapata en este estadio de su ciclo de vida.

El uso de herramientas histotecnológicas para abundar en el análisis sobre el efecto de los diferentes factores de virulencia que pudieran afectar a la garrapata, representa una alternativa a seguir para identificar mecanismos de acción directos de la bacteria *Serratia marcescens* sobre *R. microplus*. Más estudios son requeridos para establecer la ruta que sigue esta bacteria y causar la infección, así como también analizar el daño causado por las diferentes proteínas secretadas de forma individual.

## CONCLUSIÓN

La cepa de bacterias EC-35 de *S. marcescens* patógena a garrapatas reduce el grosor de la cutícula en larvas y causa pérdida de histoarquitectura tanto en larvas como en hembras adultas de *R. microplus*.

## REFERENCIAS

Aggarwal C, Paul S, Tripathi V, Paul B, Khan MA (2017) Characterization of putative virulence factors of *Serratia marcescens* strain SEN for pathogenesis in *Spodoptera litura*. J Invertebr Pathol. 143: 115–123.

Fukuto TR (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect. 87, 245–254.

Grimont PA, Grimont F (1978) The genus *Serratia*. Annu Rev Microbiol. 32(4):221-248.

Hackman RH (1982) Structure and function in tick cuticle. Ann. Rev. Entomol. 27:75-95

Hertle R (2005) The family of *Serratia* type pore forming toxins. Curr Protein Pept Sci. 6(4):313-325.

Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014) *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. J Biol Chem. 289(9):5876-5888.

Ishii K, Adachi T, Hara T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014) Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. J Invertebr Pathol. 117:61-67.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. 24(4):755-791.

Méndez-Santiago E W, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol J L, Hernández-Velázquez V M, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villarreal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal,

antifungal activity and growth-promoting characteristics. Arch microbial. 203(2): 549–559.

Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB (2012) Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. Parasitol Res. 110(5):1841-1847.

Petersen LM, Tisa LS (2013) Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. Can J Microbiol. 59(9):627-640.

Pineda-Castellanos ML, Rodríguez-Segura Z, Villalobos FJ, Hernández L, Lina L, Nuñez-Valdez ME (2015) Pathogenicity of Isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the Scarab *Phyllophaga Blanchardi* (Coleoptera). Pathogens. 4(2):210-228.

Prophet EB, Millis B, Arrington JB, Sobid LH, Eds (1995) Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), Washington D. C.

Raymann K, Coon KL, Shaffer Z, Salisbury S, Moran NA (2019). Correction for Raymann et al., "Pathogenicity of *Serratia marcescens* Strains in honey bees". *mBio*. 10(1):e02855-18.

Soenens A, Imperial J (2020) Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. Phytochem Rev. 19:577–587.

Tu S, Qiu X, Cao L, Han R, Zhang Y, Liu X (2010) Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. J Invertebr Pathol. 104(2), 75–82.

Veliz EA, Martínez-Hidalgo P, Hirsch AM (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. AIMS Microbiol. 3(3):689-705.

## Capítulo 5

### Identificación de quitinasas en la bacteria patógena a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

#### RESUMEN

Las quitinasas (E.C.3.2.1.14) son una familia de enzimas que hidrolizan el polímero lineal de quitina  $\beta$ -1,4 ligado a N-acetil-D-glucosamina, las familias GH18 y GH19 son producidas por bacterias. Reportes indican que *Serratia marcescens* secreta quitinasas. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de quitinasas en la cepa EC-35 de *S. marcescens* patógena a la garrapata *R. microplus*. La cepa EC-35 de *S. marcescens* fue utilizada en la extracción de DNA. Se diseñaron oligonucleótidos sentido y reverso para ser usados en las reacciones de PCR con base en las secuencias de genes que codifican para las quitinasas A, B y C. Los productos de amplificación fueron purificados, secuenciados y comparados con aquellas secuencias previamente reportadas. Se detectó la presencia de 3 amplicones con un tamaño aproximado de 1.7 Kb, 1.6 Kb y 1.5 Kb en la cepa EC-35, para los genes ChiA, ChiB y ChiC. El resultado de las secuencias indicó productos de 1592, 1332 y 1170 nucleótidos respectivamente. La secuencia del gen de ChiA tuvo identidad del 98.87% con la cepa S68; la secuencia del gen de ChiB y ChiC tuvieron identidad del 98.47% con la cepa BJL200, ambas pertenecientes a la bacteria *S. marcescens*. Las quitinasas son enzimas secretadas por bacterias, se cree las usan para procesar y digerir macromoléculas que contienen N-acetil glucosa amina (GlcNAc) como fuente de carbono y nitrógeno en la obtención de energía. La cepa EC-35 de *S. marcescens* patógena a garrapatas posee genes que codifican para las quitinasas A, B y C.

#### INTRODUCCIÓN

Las quitinasas (E.C.3.2.1.14) también llamadas glicosil hidrolasas (GH) son una familia de enzimas que hidrolizan el polímero lineal de quitina  $\beta$ -1,4 ligado a N-acetil-D-glucosamina, la familia GH18 es producida en todos los reinos incluidas las bacterias, mientras que la familia GH19 hay reportes de ser producidas por bacterias, virus, nematodo y garrapatas (Arakane y Muthukrishnan, 2010; Merzendorfer, 2013). El exoesqueleto de las garrapatas está formado

principalmente por la cutícula la cual es una capa compuesta por  $\alpha$ -quitina, proteína y una capa lipídica (Hackman, 1982).

La búsqueda de alternativas para el control de artrópodos ha guiado a la expresión de quitinasas recombinantes Juárez-Hernández *et al.* (2015), expresaron un gen de la quitinasa A (ChiA) la cual duplico su toxicidad con respecto a su parental; otros autores han evaluado quitinasas contra el ácaro *Varroa destructor* alcanzando una mortalidad superior al 90% (Tu *et al.*, 2010). La bacteria *S. marcescens* secreta, diferentes moléculas bioactivas entre las que se encuentran las quitinasas (Watanabe *et al.*, 1997; Méndez-Santiago *et al.*, 2021). De acuerdo con los daños histológicos previamente documentados, la identificación de quitinasas en la cepa EC-35 con vista a ser empleada como alternativa para el control de garrapatas lleva a plantear el siguiente objetivo: identificar la presencia de quitinasas en la bacteria *S. marcescens* cepa EC-35 patógena a la garrapata *R. microplus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepa de bacteria y extracción de DNA**

Bacterias de la cepa EC-35 de *S. marcescens* fueron utilizadas para la extracción de DNA. La cepa EC-35 se cultivó en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido. La extracción de DNA total se realizó a partir de 1 ml del cultivo de bacterias EC-35 con 12 h de crecimiento, siguiendo la metodología descrita por Bravo *et al.* (1998). Para las reacciones de PCR se utilizaron 100 ng de DNA.

### **Diseño de oligonucleótidos**

Se descargaron y alinearon genes previamente reportados (Cuadro 6.1), de diferentes cepas de *S. marcescens* que codifican para las quitinasas A, B y C, las cuales estaban depositadas en el GenBank del NCBI; la alineación se realizó utilizando el programa Clustal O. Secuencias consenso de entre 20 – 21 nucleótidos de cada gen de los extremos 5' y 3' fueron sintetizados para ser usados como oligonucleótidos (Cuadro 5.2).

**Cuadro 5.1.** Números de acceso de genes reportados que codifican para quitinasa

<b>Gen</b>	<b>No. acceso</b>
Quitinasa A (ChiA)	GQ855217.1; AY855211.1; KP065496.1; DQ165083.1; KF823630.1
Quitinasa B (ChiB)	JX847796.1; DQ868535.1; KJ562867.1; GQ855218.1; KF823631.1
Quitinasa C (ChiC)	JX847797.1; GU724603.1; MH646662.1; KJ155833.1; KM044040.1

**Cuadro 5.2.** Diseño de oligonucleótidos

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b> <b>5'- 3'</b>
<b>1</b>	ChiA-F1	ATG CGC AAA TTT AAT AAA CCG
<b>2</b>	ChiA-R1	TTA TTG AAC GCC GGC GCT ATT
<b>1</b>	ChiB-F2	ATG TCC GCA CGC AAA GCG GTT
<b>2</b>	ChiB-R1	TTA CGC CAC ACG GCC CAC CTT
<b>1</b>	ChiC-F2	ATG AGC ACA AAT AAC ATT AT
<b>2</b>	ChiC-R1	TTA GGC GAT GAG CTG CCA CAG

1.- Sentido, 2.- Reverso

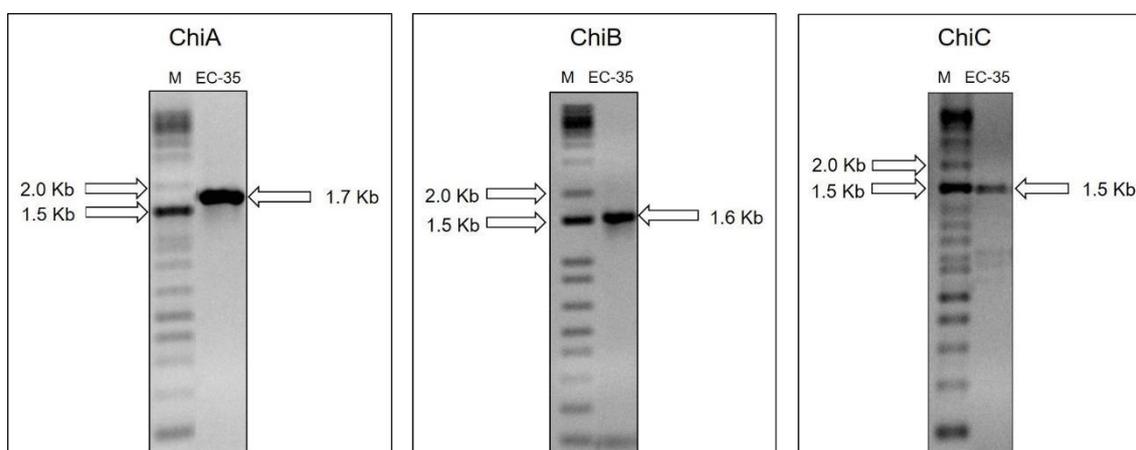
### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 45 s), alineamiento (58 °C, 58 s) y extensión (72 °C, 60 s); con una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, empleando un marcador molecular de 100 pb como referencia (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen®). Una vez visualizados se purificaron usando el kit comercial (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system,

Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tres muestras de cada producto purificado fueron secuenciadas en ambos sentidos de manera comercial, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas previamente reportadas usando el programa BLAST.

## RESULTADOS

Se detectó la presencia de 3 amplicones con un peso aproximado de 1.7 Kb, 1.6 Kb y 1.5 Kb en la cepa EC-35, para los genes ChiA, ChiB y ChiC.



**Figura 5.1.** Imagen de los productos de amplificación por PCR de los genes ChiA, ChiB y ChiC de la cepa de bacterias EC-35. M = Marcador de tamaño molecular de ácidos nucleicos.

Los productos de amplificación del DNA por PCR mostraron amplicones entre las bandas de 1000 y 1650 pb (figura 5.1). Al secuenciar los genes ChiA, ChiB y ChiC; se obtuvieron las secuencias de 1592, 1332 y 1170 nucleótidos respectivamente. La secuencia del gen de ChiA al ser comparada con las secuencias disponibles en el GenBank, tuvo identidad del 98.87% con la cepa S68 número de acceso KP065496.1; la secuencia del gen de ChiB, tuvo identidad del 98.47% con la cepa B JL200 número de acceso Z36295.1. y la secuencia del gen ChiC, tuvo identidad del 98.47% con la cepa B JL200 número de acceso Z36295.1 todas ellas pertenecientes a la bacteria *S. marcescens*.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la cepa EC-35 de *S. marcescens*, posee genes que codifican quitinasas.

Las quitinasas son consideradas como las enzimas de la muda de artrópodos, las cuales degradan la quitina a moléculas de bajo peso solubles y a oligosacárido insoluble; se cree que las bacterias las usan para procesar y digerir macromoléculas que contienen N-acetil glucosa amina (GlcNAc) como fuente de alimento; la quitina es un polisacárido estructural del exoesqueleto y revestimientos intestinales (membrana peritrófica) de artrópodos (Kramer y Muthukrishnan, 1997). La quitina es usada por bacterias como fuente de carbono y nitrógeno en la obtención de energía, secretando un coctel de quitinasas durante la patogénesis o durante la hidrólisis de la quitina de desecho del hospedero; *S. marcescens* produce tres quitinasas de la familia 18 de glicosil hidrolasas (GH), ChiA, ChiB y ChiC (Suzuki *et al.*, 2002; Merzendorfer, 2013; Oyeleye y Normi, 2018), es la bacteria más estudiada respecto a su capacidad para degradar quitina, ChiA y ChiB son exoquitinasas que degradan la cadena de quitina en sentidos opuestos; ChiC es una endoquitinasa; también producen una proteína de enlace a quitina CBP21 la cual es un polisacárido lítico monooxigenasa tipo CBM-33 y una quitobiasa la cual es otra hidrolasa (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013)

La producción de las quitinasas recombinantes ChiA, ChiB y ChiC; una quitobiasa (Chb) y una proteína de enlace a quitina (CBP) a partir de genes de *S. marcescens* mostraron actividad quitinolítica usando como sustrato quitina coloidal, encontrando mayor formación de dímeros y trímeros al combinarlas que al usarlas de forma individual (Gutiérrez-Román *et al.*, 2013).

La expresión de factores de virulencia de bacterias como lo son las quitinasas; al transformar una cepa de *B. thuringiensis* con un gen de la quitinasa A (ChiA) se generó una proteína recombinante con una toxicidad dos veces mayor a la parental contra larvas de *Aedes aegypti* reportando una CL<sub>50</sub> de 8.02 ng/mL (transformante) y 19.8 ng/mL (parental) (Juárez-Hernández *et al.*, 2015). Las quitinasas expresadas en *E. coli* a partir de una cepa de *S. marcescens* llamada GEI mostró actividad acaricida en contra de *V. destructor* cuando se combinaron a razón de 34.8 y 27.5

U/mL de ChiA – ChiB y ChiA – ChiB – ChiC alcanzaron una mortalidad mayor del 90% (Tu *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo observado en este trabajo, en donde se detectó la presencia de genes que codifican para quitinasas en la cepa EC-35 de *S. marcescens*; la cual previamente había demostrado reducir de forma drástica el grosor del exoesqueleto en larvas de garrapatas afectadas, y con base en los antecedentes bibliográficos para el uso potencial de quitinasas en el control de artrópodos, se podía proponer el uso de las quitinasas producidas por *S. marcescens* como método de control alternativo contra garrapatas *R. microplus*, esto podría representar una estrategia a seguir para evitar el uso directo de *S. marcescens* y así reducir el efecto patógeno que pudiera causar el uso directo de bacterias en el tratamiento de bovinos infestados con garrapatas debido al amplio rango de hospederos que tiene *S. marcescens*.

## CONCLUSIÓN

La cepa EC-35 de *S. marcescens* patógena a garrapatas posee genes que codifican quitinasas A, B y C.

## REFERENCIAS

Arakane Y, Muthukrishnan S (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci.* 67(2):201-216.

Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros E, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4965-4972.

Doucet D, Retnakaran A (2012) Chapter six: Insect Chitin: Metabolism, Genomics and Pest Management. *Advances in Insect Physiology*, 43: 438-496.

Gutiérrez-Román MI, Dunn MF, Tinoco-Valencia R, Holguín-Meléndez F, Huerta-Palacios G, Guillén-Navarro K (2014) Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). *World J Microbiol Biotechnol.*

30(1):33-42.

Hackman RH (1982) Structure and function in tick cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 27:75-95.

Juárez-Hernández EO, Casados-Vázquez LE, del Rincón-Castro MC, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK, Barboza-Corona JE (2015) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* producing endochitinase ChiA74 $\Delta$ sp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. *J Appl Microbiol.* 119(6):1692-1699.

Kramer K, Muthukrishnan S (1997) Mini review: Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27(11):887-900.

Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol L, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villareal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203: 549 – 559.

Merzendorfer H (2013) Insect-derived chitinases. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 136:19-50.

Oyeleye A, Normi YM (2018) Chitinase: diversity, limitations and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports* 38 BSR2018032300.

Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Watanabe T (2002) Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(5):1075-1083.

Tu S, Qiu X, Cao L, Han R, Zhang Y, Liu X (2010) Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *J Invertebr Pathol.* 104(2):75-82.

Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sørli M, Eijsink VGH (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* 280:3028-3049.

Veliz E, Martinez-Hidalgo P, Hirsch AM (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology* 3(3):689-705.

Watanabe T, Kimura K, Sumiya T, Nikaidou N, Suzuki K, Suzuki M, Taiyoji M, Ferrer S, Regue M (1997) Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of bacteriology* 179(22):7111-7117.

## Capítulo 6

### Evaluación *in vitro* de la toxicidad de la cepa EC-35 hacia el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*

#### RESUMEN

Las bacterias del género *Serratia* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son Gram-negativas con forma de bacilo. A la fecha, han sido reportadas 23 diferentes especies de *Serratia*. Se les encuentra en diversos hábitats los cuales incluyen plantas, insectos, humanos, aire, agua y suelo. Estas bacterias producen diferentes metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos; por lo que han sido propuestas para el control de nematodos en fase de vida libre y hongos fitopatógenos. Los insecticidas sintéticos de uso agrícola para el control de plagas provocan daños a los ecosistemas microbianos, afectando la fertilidad del suelo. El principio activo de algunos garrapaticidas es el mismo al de algunos insecticidas por lo que su uso en el tratamiento de bovinos infestados pudiera provocar un efecto ambiental similar al de los insecticidas. El nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* se emplea como organismo de prueba para la detección de toxicidad de muestras ambientales como aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados. El objetivo de este trabajo fue: evaluar *in vitro* la toxicidad de *S. marcescens* hacia el nematodo de vida libre *P. redivivus*. Los nematodos *P. redivivus* se cultivaron en avena fermentada. Larvas juveniles L2 fueron colectadas mediante flotación usando  $MgSO_4$  y tamizaje. Para el bioensayo 100 larvas totales fueron desafiadas durante 24 h con diferentes concentraciones de proteína total de la cepa EC-35 (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu g/mL$ ) como control se usó el buffer M9 y se incluyó el ixodicida coumafos (0.02%). Los valores del efecto post desafío se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 0.05. Los nematodos expuestos a diferentes concentraciones de proteína total de la cepa EC-35 no mostraron diferencias en la tasa de mortalidad (9.40, 10.21, 8.00, 6.60, 10.12 y 8.72% respectivamente) con respecto al grupo testigo ( $p > 0.05$ ). En este trabajo se demostró que la cepa EC-35 de *S. marcescens*, no es patógena al nematodo de vida libre *P. redivivus*. Las bacterias del género *Serratia* han sido señaladas como fuertes candidatos a ser usados como agentes

de biocontrol. Se concluye la cepa EC-35 de *S. marcescens* patógena a garrapatas *R. microplus*, no es patógena al nematodo de vida libre *P. redivivus* en condiciones *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, las especies son Gram-negativas con forma de bacilo, comúnmente se les considera como patógenos oportunistas, algunas de ellas producen un pigmento rosa o rojo que las caracteriza llamado prodigiosina (Mahlen, 2011). A la fecha, han sido reportadas 23 diferentes especies de *Serratia* (Parte *et al.* 2020). Los hábitats en donde se les encuentra son muy diversos los cuales incluyen plantas, insectos, humanos, aire, agua y suelo (Grimont y Grimont, 1978). Estas bacterias producen diferentes metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos principalmente como antiprotozoarios, antibacterianos, antimicóticos y nematicidas (Soenens e Imperial, 2020; Méndez-Santiago *et al.*, 2021). Debido a los factores de virulencia que producen han sido propuestas para el control de nematodos en fase de vida libre y hongos fitopatógenos (Méndez-Santiago *et al.*, 2021).

Los nematicidas sintéticos de uso agrícola para el control de nematodos plaga provocan daños a los ecosistemas microbianos, afectando la fertilidad del suelo; los consorcios microbianos están compuestos por asociaciones entre virus, bacterias, protozoarios, microalgas, levaduras, hongos y nematodos; (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020<sub>a</sub>, 2020<sub>b</sub>; Al-ani *et al.*, 2020). En el caso de los garrapaticidas el principio activo es el mismo al de algunos nematicidas por lo que su uso en el tratamiento de bovinos infestados con garrapatas y los desechos de aguas empleadas en la preparación de baños garrapaticidas pudiera provocar un efecto ambiental similar al de los nematicidas.

La ecotoxicología estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos; el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* se emplea como organismo de prueba aplicable al biomonitoreo; para la detección de toxicidad de muestras ambientales como aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados (Pica *et al.*, 2008). Los ixodicidas propuestos como métodos alternos para el control de garrapatas, deben ser amigables con el medio ambiente, evitando

el efecto nocivo contra organismos no blanco que causan los productos químicos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue: evaluar *in vitro* la toxicidad de *S. marcescens* hacia el nematodo de vida libre *P. redivivus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo de nematodos**

En un recipiente de plástico con capacidad para 1L se colocaron 100 g de semillas de avena y 200 mL de agua para consumo humano; la mezcla se colocó en un horno de microondas durante 2 minutos permitiendo el cocimiento de la avena y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente permaneciendo cubierto con manta de cielo. La inoculación del nematodo *P. redivivus* se realizó a partir de 20 mL de un cultivo madre, el cultivo nuevo se incubo a temperatura ambiente (20 – 30 °C) y cada 4 días se oxigenó y rehidrato. Cinco días después se empleó en el bioensayo.

### **Cultivo de bacterias**

La cepa EC-35 previamente almacenadas a -20 °C y crio preservada en medio LB líquido y 25% de glicerol se descongeló colocándose en hielo durante 15 minutos y se usó como inóculos en cultivos de 25 ml de medio LB. El medio LB se complementó agregando otros reactivos de la siguiente forma (en gramos por litro): NH<sub>4</sub>Cl, 1.07; KCl, 1.5; Tris, 18.91; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.19; glucosa, 5. Los cultivos se incubaron con agitación constante a 200 rpm y 30 °C durante 4 días, posteriormente se concentró por centrifugación a 4500-x g, desechando el sobrenadante, el concentrado se solubilizó en 3 mL de agua destilada estéril y se cuantificó la proteína total de bacterias EC-35 mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

### **Colecta de nematodos**

El cultivo de *P. redivivus* se diluyó 1:1 en buffer M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 225 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 220 mM; NaCl, 100mM; MgSO<sub>4</sub>,10 mM); posteriormente se filtró en tamices de diferente número (80, 100, 200, 325). El concentrado final del tamiz de 325 se recuperó en tubos de 15 mL y fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla con harina y nematodos fue

resuspendida en un volumen igual de MgSO<sub>4</sub> (200 g/L), nuevamente se centrifugo y el sobrenadante se recuperó; los nematodos flotantes en el sobrenadante se vertieron en un tamiz numero 400 donde se lavó con buffer M9 para eliminar el MgSO<sub>4</sub>; de aquí se recuperaron los nematodos para ser empleados en el bioensayo.

### **Bioensayo**

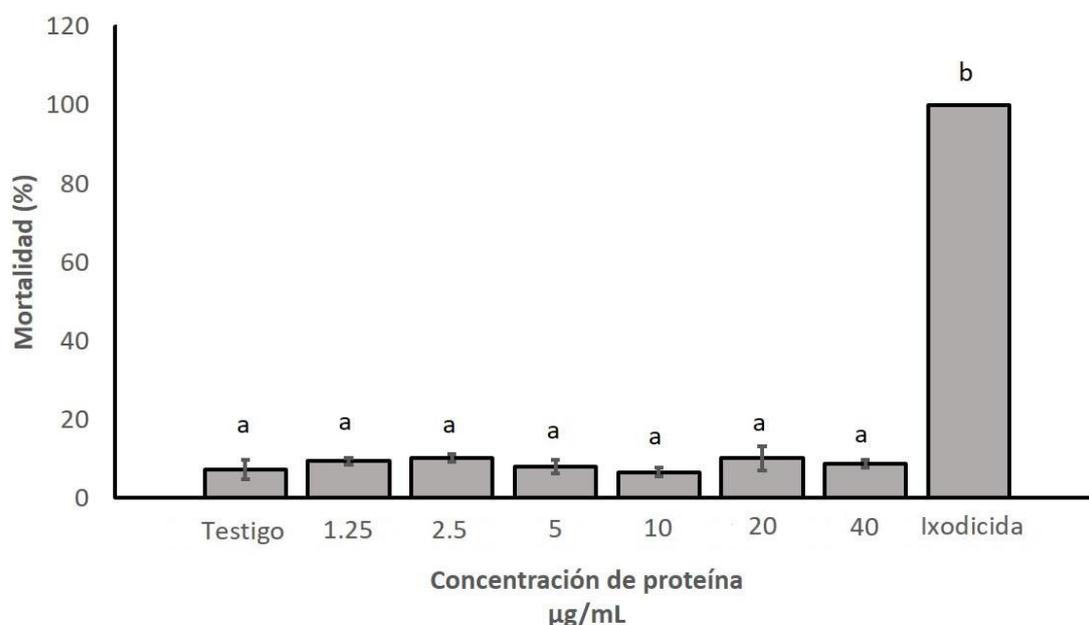
En tubos de 1.5 mL se colocaron 100 larvas juveniles L2 las cuales fueron desafiadas con diferentes concentraciones de proteína total de la cepa EC-35 (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL) como control se usó el buffer M9 y se incluyó el ixodicida coumafos (0.02%) el volumen final en cada tubo fue 100 µL. Se realizaron tres repeticiones. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (25 - 30 °C) y se realizó el conteo de mortalidad.

### **Análisis estadístico**

Los porcentajes de mortalidad de larvas L2 fueron transformados al arco seno  $\sqrt{\text{porcentaje}}$  para obtener una distribución normal. Los valores del efecto post desafío a diferentes concentraciones de proteína de la cepa EC-35 y los grupos control se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), posteriormente una comparación múltiple de medias usando la prueba de Tukey, a un nivel de significancia del 0.05. Se usó el programa estadístico SAS versión 6.0.

## **RESULTADOS**

Los nematodos expuestos a diferentes concentraciones de proteína total de la cepa EC-35 (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/mL) no mostraron diferencias en la tasa de mortalidad (9.40, 10.21, 8.00, 6.60, 10.12 y 8.72% respectivamente) con respecto al grupo testigo ( $p > 0.05$ ) pero si con respecto al grupo expuesto al coumafos en donde la mortalidad fue del 100% a las 24 h post exposición (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Mortalidad del nematodo *P. redivivus* expuesto a diferentes concentraciones de proteína total de la cepa de bacterias EC-35. Las barras indican el porcentaje de mortalidad promedio  $\pm$  error estándar, diferente literal indica diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la cepa EC-35 de *S. marcescens*, no es patógena al nematodo de vida libre *P. redivivus*.

Las bacterias del género *Serratia* han sido señaladas como fuertes candidatos a ser usados como agentes de biocontrol, esto debido a que tienen la capacidad de producir diferentes metabolitos secundarios como: prodigiosina, carbapenem, sodorifen, oocidin A, serrawetin, rubiwetin y altiomicin; los cuales tienen efectos antimicrobianos principalmente como antiprotozoarios, antibacterianos y antimicóticos (Soenens e Imperial, 2020). Células de bacterias de la cepa llamada NOD15 de *Serratia sp.* en pruebas *in vitro* causó mortalidad a los nematodos *Nacobbus aberrans*, *Haemonchus contortus* y *P. redivivus* del 88%, 100% y 100% a las 120 h, 12 h y 12h post exposición respectivamente (Méndez-Santiago *et al.*, 2021). Estos datos difieren con el comportamiento observado a la exposición de la cepa EC-35 hacia el nematodo *P. redivivus*, en donde la tasa de mortalidad más alta fue del 10.21% sin que esto representara una diferencia con respecto al grupo

testigo. Las diferencias observadas en el efecto de ambas cepas de *Serratia* hacia *P. redivivus* podría deberse a la producción de diferentes metabolitos en ambas cepas debido a la adaptación de las bacterias al hábitat en donde se localizaron antes de ser aisladas, NOD15 se aisló de la raíz de *Mimosa púdica* lo cual hace suponer una competencia por el nicho ecológico entre bacterias y nematodos, mientras que EC-35 se aisló de una garrapata *R. microplus* muerta; otra diferencia fue que la cepa NOD15 es cultivada en presencia de quitina coloidal, lo cual estimuló la producción de quitinasas. El uso del nematodo de vida libre *P. redivivus* ha mostrado ser un agente de prueba con el que se puede evaluar el efecto dosis – respuesta hacia algún compuesto tóxico, sin embargo, otros ensayos toxicológicos deberían ser empleados para evaluar la toxicidad aguda usando diferentes organismos de prueba como *Allium sp.*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*, los cuales tienen diferentes hábitats (Díaz *et al.*, 2004).

## CONCLUSIÓN

La cepa EC-35 de *Serratia marcescens* patógena a *R. microplus*, no es patógena al nematodo de vida libre *P. redivivus* en condiciones *in vitro*.

## REFERENCIAS

Aguilar-Marcelino L, Mendoza-de-Gives P, Al-Ani LKT, Lopez-Arellano MA, Gomez-Rodriguez O, Villar-Luna E, Reyes-Guerrero DE (2020) Chapter 26: Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. En Sharma V, Salwan R, Al-Ani LKT (Eds) Molecular aspects of plant beneficial microbes in agricultura. Academic press 336-349.

Aguilar-Marcelino L, Al-Ani LKT, Castañeda-Ramirez GS, Garcia-Rubio V, Ojeda-Carrasco JJ (2020) Chapter 3: Microbial technologies to enhance crop production for future needs. En Rastegari AA, Yadav AN, Yadav N (Eds) New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Trends of microbial biotechnology for sustainable agriculture and biomedicine systems: diversity and functional perspectives. Elsevier. 29-47.

Al-ani LKT, Aguilar-Marcelino L, Fiorotti J, Sharma V, Sharif SM, Furtado EL, Wijayawardene NN, Herrera-Estrella A (2020) Chapter 2: Biological control agents and their importance for plant health. En Singh JS, Vimal SR (Eds) Microbial services in restoration ecology. Elsevier. 13-36.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Díaz BMC, Ronco A, Pica GY (2004) Capítulo 4: Protocolos de ensayo. En Castillo G (Ed) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México 47-98.

Grimont PA, Grimont F (1978) The genus *Serratia*. Annu Rev Microbiol. 32(4):221-248.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. 24(4):755-791.

Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol JL, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villarreal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. Arch microbial. 203(2): 549–559.

Parte AC, Sarda Carbase J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M (2020) List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol. 70:5607-5612.

Pica GY (2008) Ensayo de toxicidad con el nematodo *Panagrellus redivivus*. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. INE 139-155.

Soenens A, Imperial J (2020) Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. Phytochem Rev 19:577-587.

## DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIÓN

El análisis de garrapatas enfermas y muertas permitió el aislamiento de bacterias a partir de lo cual se logró aislar e identificar una bacteria de la especie *S. marcescens* con efecto ixodicida a *R. microplus*. A la fecha, solamente habían sido documentadas bacterias de la especie *Bacillus thuringiensis* como patógenas a garrapatas adultas *R. microplus* (Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2010; Romo-Martínez *et al.*, 2013; Lormendez *et al.*, 2019). Esto indica que aún falta mucho por investigar con respecto a bacterias causantes de enfermedades en *R. microplus* las cuales pudieran ser empleadas como un mecanismo de control biológico. La caracterización de la virulencia de *S. marcescens* mediante la exposición de garrapatas a diferentes dosis de proteína, logró demostrar la existencia de una correlación entre mortalidad de larvas y cantidad de proteína usada en el desafío; lo cual, hasta ahora, se había reportado solamente con larvas de coleóptero y lepidóptero (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2010; Bidari *et al.*, 2017). Con lo cual se podría deducir que *S. marcescens* afecta principalmente artrópodos en estadio de larva o bien que los artrópodos son más susceptibles a esta bacteria en este estadio de su ciclo de vida. Con el desafío de garrapatas adultas en baños de inmersión, no se observó una correlación dosis – respuesta, esto probablemente causado por el número de bacterias que logan penetrar al interior del cuerpo de la garrapata, sin embargo, la bacteria resulto altamente patógena por ingestión oral e inoculación directa lo cual concuerda con lo reportado para coleópteros, lepidópteros y dípteros (Nuñez-Valdez *et al.*, 2008; Raymann *et al.*, 2018). El análisis de daños histomorfológicos en las garrapatas afectadas mostró un adelgazamiento del exoesqueleto y pérdida de la histoarquitectura, se ha documentado que *S. marcescens* produce enzimas como proteasas, quitinasas, hemolisinas, lipopolisacaridos, etcétera (Mahlen, 2011; Patil *et al.*, 2012, Petersen y Tisa, 2013; Pineda-Castellanos *et al.*, 2015; Raymann *et al.*, 2018; Soenesn *et al.*, 2020); por lo que estos daños posiblemente pudieron ser causados por las diferentes enzimas. El análisis molecular de la cepa EC-35, detectó genes que codifican para quitinasas ChiA, ChiB y ChiC las cuales han sido asociadas con el control de artrópodos tales como *Varroa destructor* y *Aedes aegypti* (Tu *et al.*, 2010; Juárez-Hernández *et al.*, 2015). La presencia de quitinasas abren una posibilidad de poder utilizar estas enzimas para ser evaluadas directamente contra garrapatas.

La evaluación toxicológica contra un organismo no blanco, reveló que la cepa EC-35, no es patógena hacia otra especie de organismos, algo que difirió con lo reportado por (Méndez-Santiago *et al.*, 2021), quien reportó una cepa de *S. marcescens* patógena a nematodos, esta diferencia podría deberse a los diferentes factores de virulencia secretados por cada una de las cepas de bacteria.

El uso de la bacteria *S. marcescens* o sus metabolitos como alternativa de control contra la garrapata *R. microplus*, representa una alternativa a seguir la cual pueda remplazar el uso de ixodicidas químicos, sin embargo, se necesitan más investigaciones por desarrollar.

Se concluye que se logró aislar, identificar y caracterizar una cepa de bacterias de la especie *S. marcescens* patógena a la garrapata *R. microplus* con presencia de quitinasas y no tóxica hacia una agente de prueba.

## REFERENCIAS

Bidari F, Shams-Bakhsh M, Mehrabadi M (2017) Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). *J Appl Entomol.* 1-11.

Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Romo-Martínez A, Hernández-Velázquez V, Bravo A, Pérez D (2010) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *J Insect Sci* 10(186):1-6.

Jeong H, Mun H, Oh H, Kim S, Yang H, Kim I, Lee H (2010) Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia sp.* EML-SE1 against diamondback moth. *J Microbiol.* 48(4):541-545.

Juárez-Hernández EO, Casados-Vázquez LE, del Rincón-Castro MC, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK, Barboza-Corona JE (2015) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* producing endochitinase ChiA74Δsp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. *J Appl Microbiol.* 119(6):1692-1699.

Lormendez C, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez V, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramirez G, Lina-Garcia L, Peña-Chora G

(2019) Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* 9:17586.

Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4):755-791.

Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol L, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villareal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203: 549 – 559.

Núñez-Valdez ME, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, Gutierrez M del C, Villalobos FJ (2008) Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 74(3):802-810.

Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB (2012) Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res.* 110(5):1841-1847.

Petersen LM, Tisa LS (2013) Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol.* 59(9):627-640.

Pineda-Castellanos ML, Rodríguez-Segura Z, Villalobos FJ, Hernández L, Lina L, Núñez-Valdez ME (2015) Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* toward larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). *Pathogens* 4:210-228.

Raymann K, Coon K, Shaffer Z, Salisbury S, Moran N (2018) Pathogenicity of *Serratia marcescens* strain in honey bees. *mBio* 9(5): e01649-18.

Romo-Martínez A, Fernández-Ruvalcaba M, Hernández-Velázquez VM, Peña-Chora G, Lina-García LP, Osorio-Miranda J (2013) Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Res J Agrric Sci Rev* 2(3):64-79.

Soenens A, Imperial J (2020) Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochem Rev.* 19:577–587.

Tu S, Qiu X, Cao L, Han R, Zhang Y, Liu X (2010) Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *J Invertebr Pathol.* 104(2), 75–82.

## ANEXOS



# Characterization of a strain of *Serratia* sp. with ixodicide activity against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*

Edgar Castro-Saines<sup>1,2</sup> · Ruben Hernandez-Ortiz<sup>2</sup> ·  
Rodolfo Lagunes-Quintanilla<sup>2</sup> · Guadalupe Peña-Chora<sup>3</sup>

Received: 16 October 2020 / Accepted: 22 June 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

## Abstract

Cattle ticks are considered the most important ectoparasite in the livestock industry. *Rhipicephalus microplus* causes economic losses both through direct feeding on livestock and through disease transmission. Reports of the failure of chemical ixodicides to control this tick have led to a search for control alternatives, such as bacteria with ixodicide activity. The objective of this work was to select a bacterial strain with ixodicide activity against *R. microplus*. In total, 83 bacterial strains were isolated from soil and dead *R. microplus* specimens, and all strains were evaluated against larvae in a screening test. Bacteria with ixodicide activity were evaluated in larvae and engorged adult female ticks. The larvae were challenged using the larval immersion test (LIT) with 20 µg/mL total protein. The median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) for larvae was obtained by using nine total protein concentrations. Engorged adult female ticks were challenged using the adult immersion test (AIT) with six protein concentrations. We evaluated adult mortality on day 10, oviposition rate on day 14 and hatching rate on day 40 after challenge. Only one bacterial strain (EC-35) showed ixodicide activity against larvae and adult *R. microplus*. The highest larval mortality, 52.3%, occurred with a total protein concentration of 40 µg/mL, and the LC<sub>50</sub> was 13.9 µg/mL of protein. In adults, a total protein concentration of 10 µg/mL had the highest mortality (55%), oviposition inhibition (50.9%) and reproductive potential inhibition (52.5%). However, there was no significant effect on hatching. The 16S rRNA gene sequence showed 99% identity of EC-35 with *Serratia* sp.

**Keywords** Bacteria · Ectoparasite · Larval immersion test · Adult immersion test

---

✉ Guadalupe Peña-Chora  
guadalupe.penac@uaem.edu.mx

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad, 1001, Colonia Chamilpa, CP 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, Colonia Progreso, CP 62550 Jiutepec, Morelos, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad, 1001, Colonia Chamilpa, CP 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

## Introduction

*Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite affecting cattle and other domestic animals with a worldwide distribution throughout the tropics. This species is important for the livestock industry due to economic losses generated by the transmission of hemoparasites, such as *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* (Jongejan and Uilenberg 2004). The main control measure for *R. microplus* is synthetic ixodicides, but their effectiveness is limited due to the appearance of resistant tick populations in the field caused by the frequency of treatments (George et al. 2004). Furthermore, in worldwide tick populations that are simultaneously resistant to organophosphates, pyrethroids, amitraz, macrocyclic lactones (ivermectin), phenylpyrazoles and fluzuron have been reported in such countries as Australia, USA, Mexico, Colombia, Uruguay, Brazil, Argentina and South Africa (Rodríguez-Vivas et al. 2018).

An alternative to control the *R. microplus* population could be the use of microorganisms, such as bacteria. Entomopathogenic bacteria have the ability to secrete toxic proteins and secondary metabolites into the extracellular environment, contributing to the virulence of the bacteria. Genera described to have entomopathogenic effects include *Bacillus*, *Photobacterium*, *Xenorhabdus*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Yersinia* (McQuade and Stock 2018). However, the only species to have been commercialized for pest control are *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Serratia entomophila* for use against lepidopteran, coleopteran and dipteran insects, respectively (Lacey et al. 2015). No bacteria-based product is used to control *R. microplus* in the field, and there are only a few reports of trials in vitro (Fernández-Ruvalcaba et al. 2010; Lormendez et al. 2019) with strains of *B. thuringiensis*. Thus, the goals of this work were to isolate bacterial strains from dead *R. microplus* and soil, evaluate them against *R. microplus* larvae and adults, select bacterial strains with ixodicide activity against this tick, and identify the bacteria at the genus level.

## Materials and methods

### Study site

This work was performed in the Plant Parasitology Laboratory at the Biological Center Research of the Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico (CIB-UAEM) and in the Tick Laboratory of the National Center of Disciplinary Research in Animal Health and Safety of the National Institute for Forestry, Agricultural and Livestock Research (CENID-SAI/INIFAP) in Jiutepec, Morelos, Mexico.

### Isolation, selection and culture of bacteria

From February to November 2018, in total 160 dead *R. microplus* adult females were collected from 16 cattle-producing ranches located near the coasts of the Gulf of Mexico and Pacific Ocean (from 17° 59' 20.3" N, 90° 56' 14.1" W up to 23° 19' 38.6" N, 97° 58' 24.8" W and from 19° 51' 25.5" N, 103° 46' 24.7" W up to 21° 49' 23.6" N, 105° 11' 2.7" W). The ticks were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 10 s and washed twice with sterile distilled water. Subsequently, a tick was placed in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube, where it was fragmented using a sterile dissection needle; then, 1 mL

of Luria–Bertani (LB) culture medium was added, and the tube was incubated for 24 h at 30 °C. Next, to obtain single colonies, a loop of the culture was streaked on solid LB medium in Petri dishes and incubated at 30 °C for 24 h. Subsequently, each single colony was grown individually in a petri dish on solid LB for 72 h. Finally, the culture was mixed with liquid LB and 25% glycerol, and the mixture was placed in a tube in a final volume of 1 mL for cryopreservation at –20 °C until use.

Prior to bioassays with ticks, the tube containing the cryopreserved bacteria was thawed on ice for 15 min and used as the inoculum for 25 mL of LB medium in triplicate. The LB was supplemented with the following additional reagents (in g/L): NH<sub>4</sub>Cl, 1.07; KCl, 1.5; Tris, 18.91; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.19; glucose, 5. The culture was incubated at 30 °C with constant shaking at 200 rpm for 4 days. Then, the culture was concentrated by centrifuging at 4500×g, discarding the supernatant, and resuspending the concentrate in 3 mL of sterile distilled water. Total protein was quantified using the Bradford technique (Bradford 1976).

## Ticks

The bioassays were performed using the Media Joya strain of *R. microplus* originally isolated in Tapalpa, Jalisco, Mexico, which is susceptible to ixodicides and is maintained by artificial infestations on calves within the CENID-SAI/INIFAP facility. In brief, a 120 kg Holstein–Friesian calf was infested with 0.5 g of tick larvae. Twenty-one days later, engorged female ticks were collected directly from the bovine skin and placed in a Petri dish to oviposit.

## Bioassays with tick larvae

The ixodicide activity bioassay was performed for each bacterial strain using three replicates of the larval immersion test (LIT), as described by Klafke et al. (2006). Modifications of the technique consisted of replacing the ixodicide and Triton X-100 with total protein from each bacterial strain and Tween-20, respectively, and that the tick larvae were 30–40 days old. Briefly, in a 1.5-mL microcentrifuge tube, we added 20 µg of total bacterial protein, 1% Tween-20 and sterile distilled water in a final volume of 1 mL. The control group received sterile distilled water and Tween-20 at the same concentration. Subsequently, 200 larvae were immersed for 10 min, and then the larvae were placed in filter paper packages and incubated at 27 ± 2 °C with 80% relative humidity (RH). With the ixodicide activity strain, the mortality rate was evaluated at 1, 2, 4 and 8 days after immersion. Larvae that moved were considered alive, and those that did not show any movement were considered dead.

To determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of the ixodicide activity strain for larvae, nine concentrations of total protein were used (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 and 40 µg/mL), and the mortality rate was quantified 4 days after exposure.

## Bioassays with engorged adult ticks

The effect of total protein was evaluated on engorged adult ticks using the adult immersion test (AIT) (Drummond et al. 1973), where the mortality, oviposition and egg hatching (fertility) rates were calculated. Six concentrations of total protein were evaluated (1.25, 2.5, 5, 10, 20 and 40 µg/mL) in sterile distilled water and Tween-20 at a final concentration of 1%.

A total of 45 ticks were used for each protein concentration and were divided into three subgroups of 15 ticks each, and the average weight of each group was similar. The ticks were immersed individually for 10 min in a 1 mL aliquot of the corresponding total protein concentration treatment. The control group was immersed in sterile distilled water with Tween-20. After challenge with total bacterial protein, the ticks were placed individually in 24-well polyethylene plates (Cell Wells; Corning Glass Works, Corning, NY, USA) and incubated at 27 °C and 80% RH for 14 days. Mortality was evaluated 10 days after challenge, and ticks were considered to be dead when they showed darkening of the cuticle and no movement of the Malpighian tubules or legs. The oviposition rate was evaluated 14 days after challenge by weighing the egg mass. The eggs were collected and placed in glass vials with a cotton plug and incubated under the same conditions as adult ticks for 25 days. Next, the hatching rate was evaluated to determine the inhibition of reproductive potential.

### Statistical analysis

The mortality rate of larvae and engorged females, as well as the egg hatching rate, were ln transformed to obtain a normal distribution. The difference in mortality rate between the control and each bacterial treatment in the bioassay with larvae was analyzed using a Student's t-test. The effects of postexposure time and protein concentration on mortality of both larvae and engorged females and on reproductive variables were analyzed by ANOVA followed by a multiple comparison of means using Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ), using the SAS v.6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The  $LC_{50}$  was calculated by Probit analysis using the Polo Plus 2003 statistical program.

### Identification of bacterial genus

One mL of the sample of bacteria with ixodicide activity after 12 h of growth in LB medium was used for total DNA extraction according to Bravo et al. (1998). Next, 100 ng of DNA was used as a template in each PCR. The identification of bacterial genera was performed by means of PCR amplification and 16S rRNA gene sequencing techniques using the universal oligonucleotide primers, forward 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse 5'-GTTACCTTGTACGACTT-3' (Soufiane and Cote 2009). The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 96 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation (96 °C, 50 s), annealing (50 °C, 45 s) and extension (72 °C, 60 min) and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR product was purified using a commercial kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system, Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. The purified product was sequenced at the Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional Autónoma de México. The sequence obtained from the 16S rRNA gene was compared with those previously reported in the GenBank database (NCBI) using the Blast program.

### Ethics approval

Animal welfare statement. The production of ticks on cattle was approved by the Animal Experimentation and Ethics Committee of the Nacional Center of Disciplinary Research in Animal Health and Safety of the National Institute for Forestry, Agricultural

and Livestock Research (CENID-SAI/INIFAP). This research took ethical and methodological aspects into consideration in accordance with the Mexican regulations on the use, housing and transportation of experimental animals (NOM-062-ZOO-1999 and NOM-051-ZOO-1995).

## Results

### Bioassays with tick larvae

A total of 83 strains were isolated from the dead female tick and soil samples. The mortality was not significantly different from that of the control in 82 of the strains. Only one strain—named EC-35—showed ixodicide activity against larvae of *R. microplus*. The mortality rate of the treated group was higher than that of the control group 1 day after exposing *R. microplus* larvae to 20 µg/mL of total protein of the EC-35 strain, with means of  $26.0 \pm 1\%$  and  $3.1 \pm 0.7\%$ , respectively; on days 2, 4 and 8, there were no significant differences in mortality (Table 1).

The mortality rate of tick larvae exposed to various total protein concentrations differed from that of the control group (Fig. 1). The group exposed to 0.16 µg/mL protein had the lowest mortality rate (17.4%), and the groups exposed to 2.5–40 µg/mL total protein had the highest mortality rates (ca. 50%). There were differences in mortality rate among the four lowest protein concentrations tested (0.16, 0.31, 0.63, and 1.25 µg/mL) increasing from 17.6 to 35.2%, respectively; but no significant differences in mortality rate among the five highest protein concentrations (Fig. 1). Probit analysis estimated an  $LC_{50}$  of 13.89 µg/mL of total protein (Table 2).

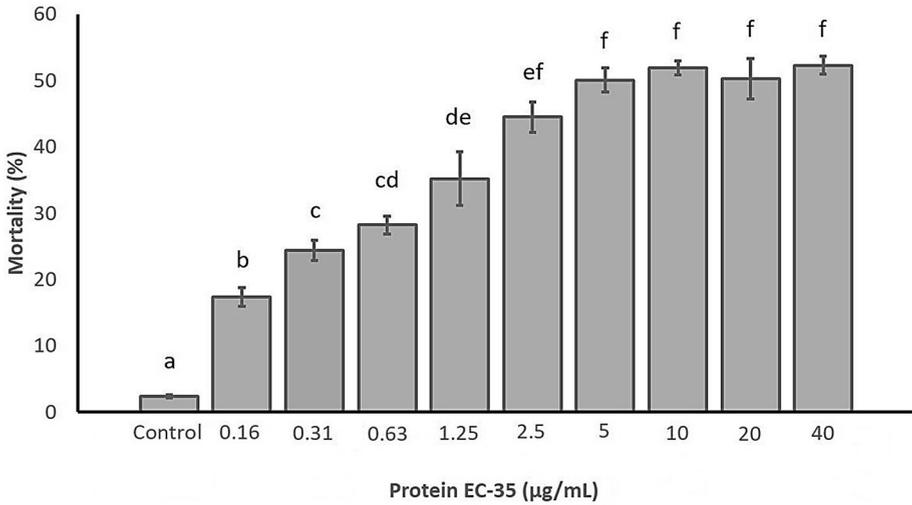
### Bioassays with engorged adult ticks

The mean weight of the engorged female ticks ( $n=15$ ) used for this study was  $4.65 \pm 0.027$  g and did not differ among the subsets assigned to each treatment (Table 3). The effects of the various total protein concentrations of the EC-35 strain on the weight of the egg mass and hatching percentage are shown in Table 3: all treated egg masses were lighter than the untreated control, but egg mass weight did not differ (much) among the treatments, and about half of the eggs hatched in all treatments as well as the control. The treatments affected the mortality rate, reproductive efficiency index, inhibition of oviposition and inhibition of reproductive potential (Table 4).

**Table 1** Mean ( $\pm$ SE) mortality rate of *Rhipicephalus microplus* larvae at various intervals post challenge after immersion in 20 µg/mL total protein concentration of the EC-35 strain

Treatment	Day 1	Day 2	Day 4	Day 8
Control	$0.00 \pm 0.00a$	$2.03 \pm 0.37ab$	$3.02 \pm 0.63b$	$9.63 \pm 1.09c$
EC-35	$26.40 \pm 1.28a$	$34.30 \pm 0.77a$	$39.63 \pm 3.38a$	$35.23 \pm 7.12a$

Means within columns that are followed by a different letter are significantly different (ANOVA:  $p < 0.05$ )



**Fig. 1** Mean ( $\pm$ SE) mortality (%) of *Rhipicephalus microplus* larvae challenged with a range of total protein concentrations of the EC-35 bacterial strain. Means that do not share a letter are significantly different (Tukey's test:  $p < 0.05$ )

**Table 2** Probit analysis values of *Rhipicephalus microplus* larvae challenged with a range of total protein concentrations of the EC-35 strain

n	Slope	LC <sub>50</sub>	95% CI
2758	0.437 $\pm$ 0.034	13.89	8.88 $\pm$ 23.58

LC<sub>50</sub> median lethal concentration, CI confidence interval

**Table 3** Mean ( $\pm$ SE; n=3) reproductive parameters of engorged adult female *Rhipicephalus microplus* challenged with a range of total protein concentrations (TPC) of the EC-35 strain

TPC EC-35 (µg/mL)	Female weight (g)	Egg masses weight (g)	Hatching (%)
Control	4.647 $\pm$ 0.02a	1.992 $\pm$ 0.01a	44.22 $\pm$ 4.16a
1.25	4.659 $\pm$ 0.02a	1.213 $\pm$ 0.04bc	51.82 $\pm$ 3.16a
2.5	4.655 $\pm$ 0.02a	1.322 $\pm$ 0.14bc	52.55 $\pm$ 2.61a
5	4.657 $\pm$ 0.01a	1.337 $\pm$ 0.03bc	53.06 $\pm$ 2.68a
10	4.652 $\pm$ 0.02a	0.979 $\pm$ 0.09c	42.40 $\pm$ 3.00a
20	4.636 $\pm$ 0.01a	1.462 $\pm$ 0.13b	52.85 $\pm$ 2.70a
40	4.667 $\pm$ 0.02a	1.158 $\pm$ 0.09bc	50.76 $\pm$ 2.40a

Coefficients of variation of 0.065, 11.49 and 2.84%, respectively, are shown. Means within a column that do not share a letter are significant different (Tukey's test:  $p < 0.05$ )

### Identification of the bacterial genus in the strain EC-35

The PCR product from the DNA amplification showed an amplicon between 1000 and 1650 bp long, as observed in agarose gel stained with ethidium bromide. The 1432 bp long

**Table 4** Evaluation of the effect of a range of total protein concentrations (TPC) of the EC-35 strain on mean ( $\pm$ SE; n=3) reproductive parameters per group of engorged adult female *Rhipicephalus microplus*

TPC EC-35 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mortality (%)	Oviposition inhibition (%)	IRP (%)
Control	0a	0a	0a
1.25	42.22 $\pm$ 4.45b	39.36 $\pm$ 1.87bc	28.12 $\pm$ 5.10b
2.5	44.44 $\pm$ 9.70b	33.73 $\pm$ 7.50bc	20.28 $\pm$ 10.95b
5	46.66 $\pm$ 10.20b	33.06 $\pm$ 1.78bc	18.64 $\pm$ 6.30b
10	55.55 $\pm$ 8.02b	50.93 $\pm$ 4.49c	52.53 $\pm$ 5.46b
20	33.33 $\pm$ 6.67b	26.44 $\pm$ 6.38b	9.34 $\pm$ 16.64b
40	42.22 $\pm$ 5.89b	42.25 $\pm$ 4.63bc	30.61 $\pm$ 14.87b

*IRP* inhibition of reproductive potential

The coefficients of variation were 8.91, 18.34 and 32.28%, respectively. Means within a column that do not share a letter are significantly different (Tukey's test:  $p < 0.05$ )

sequence of the 16S rRNA gene from the EC-35 strain, when compared with the sequences available in the GenBank (NCBI) database, showed 99% identity with *Serratia marcescens*. MegaBLAST analysis revealed that the EC-35 strain 16S ribosomal RNA gene partial sequence has a 99.86% identity with *Serratia marcescens* strain SYJ1-9 ribosomal RNA gene, partial sequence GenBank accession number KR262852.1. Nucleotide sequence data were submitted to GenBank with accession number MT703954.1. Strains showing no significant differences in mortality were not identified.

## Discussion

In this study, we found that a strain similar to *S. marcescens* showed ixodicide activity against *R. microplus* larvae and adult females. Nevertheless, sequencing of the genomes of *S. marcescens* strains identified 6 or 7 rRNA operons (Li et al. 2015), making this gene a less than ideal candidate for species-level identification. Future studies should be conducted for species-level designation using concatenated amino acid sequences of proteins GyrB and RpoD, which are conserved in bacteria. *Serratia marcescens* has been previously identified in *R. microplus* eggs in a study of the tick bacteriome (Andreotti et al. 2011). Similarly, 16S rRNA sequencing of a group of cultivable bacteria isolated from *Amblyomma cajennense* eggs found 17 species of bacteria, including *S. marcescens* (Machado-Ferreira et al. 2015). Neither of those reports evaluated the lethal effects of this bacterium on ticks.

Different secretions of proteins produced by *Serratia* species, such as pore forming toxins (Hertle 2005), hydrolytic enzymes (Veliz et al. 2017) and biosurfactants (Clements et al. 2019), could be used as biocontrol agents against ticks because they produce hemolysins, chitinases and lipopeptides able to degrade lipids. These proteins could degrade the cuticle of the tick that is composed mainly of chitin and a layer lipid (Hackman 1982). A biocontrol method against *R. microplus* using secretions produced by *Serratia* species could avoid side effects of *Serratia* on the treatment of bovines, including a possible pathogenesis due to the wide host range of *Serratia*, which includes arthropods, humans and (other) mammals.

The *in vitro* ixodicide effect of *Serratia* sp. on *R. microplus* larvae was observed in the initial bioassays using a 20 µg/mL total protein concentration. Larvae that had been subjected to protein from *Serratia* sp. had a 26% mortality rate 1 day after the challenge, and the highest mortality was found on day 4 at 39.6%, although there were no significant differences in mortality among days 1, 2 and 8. Larvae of *R. microplus* cultivated under laboratory conditions have an average life span of 60 days. Larvae used for the bioassays were 30–40 days old. At an intermediate age, their immune system could cope with a probable infection, and only the weakest larval ticks died in the early days after challenge. The isolation of *S. marcescens* from the sea sponge *Haliclona amboinensis* and the sequence of its genome indicate the presence of genes that code for amylases, lipases and proteases (Cheng et al. 2018); these enzymes could be responsible for the degradation of macromolecules present in the tick cuticle, which could allow the bacteria to penetrate the tick. When the tick larvae were challenged with different total protein concentrations of the EC-35 strain, the highest mortality was 52% using a concentration of 40 µg/mL of total protein, whereas the LC<sub>50</sub> was 13.9 µg/mL, a relatively low dose when compared to that reported for other mites and bacteria, such as *Psoroptes cuniculi* challenged with protein from *B. thuringiensis*, where 1.3 mg/mL of total protein was necessary to kill 50% of mites (Dunstand-Guzmán et al. 2015). In assays with *R. microplus* and *P. cuniculi*, the maximum mortality rate only slightly exceeded 50% despite using protein concentrations higher than the LC<sub>50</sub>, whereas in bioassays with *Phyllophaga* larvae fed 10<sup>8</sup> cells of *Serratia entomophila*, the mortality rate was 72% (Nuñez-Valdez et al. 2008). Lepidopteran larvae fed cabbage leaves sprayed with a liquid culture of *S. marcescens* showed 91.7% mortality (Jeong et al. 2010). The differences in the mortality rate caused by these bacteria could be observed because the challenge to ticks in this study was by immersion bath, where the main contact route is through the cuticle, whereas in tests with Coleoptera and Lepidoptera, the bacteria are ingested, which is more likely to enable bacteria to penetrate through the gut.

The virulence of other *S. marcescens* strains has been associated with the hemolytic activity of such proteases as serralyisin, chitinases, gelatinases, DNases and siderophore production (Pineda-Castellanos et al. 2015; Raymann et al. 2018; Méndez-Santiago et al. 2021). Hemolysins produced by *S. marcescens* are pore-forming toxins known as Sh1A and Sh1B, which cause lysis of erythrocytes and eukaryotic cells (Hertle 2005). The serralyisin metalloprotease allows bacteria to suppress the cellular immunity of *Bombyx mori* by reducing the adhesive properties of hemocytes in this insect (Ishii et al. 2014). Other *Serratia* species also produce metalloproteases, gelatinases, alkaline proteases and chitinases (Matsumoto 2004; Pinna et al. 2009; Kwak et al. 2015). An *S. grimesii* metalloprotease called grimelysin has proteolytic activity on actin (Bozhokina et al. 2011). Our bioassays with engorged adult female ticks using total protein concentrations ranging from 1.25 to 40 µg/mL had a maximum mortality rate of 55.5%, and a protein concentration of 10 µg/mL caused 50.9% inhibition of oviposition and 52.5% inhibition of reproductive potential. Nevertheless, no significant differences were observed among the different total protein concentration treatments with the EC-35 strain. The peak mortality was at a dose of 10 µg/mL (55%), with lower values on either side of this peak (this was also true of oviposition inhibition and IRP). This phenomenon, called hormesis inverted U-shaped, describes the biphasic dose–response relationship exhibiting low-dose stimulation and high-dose inhibition (Calabrese and Baldwin 2002).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is considered the most successful biopesticide; it produces protoxins known as Cry and Cyt, which, when ingested by insect larvae, form pores in intestinal cells (Bravo et al. 2011). Engorged female *Argas persicus* ticks were exposed to *B. thuringiensis kurstaki*, resulting in 100% mortality 5 days after being exposed to a

concentration of 1 mg/mL of total protein; *B. thuringiensis israelensis* caused 100% mortality at 2.5 mg/mL, whereas *B. thuringiensis thuringiensis*, at a 5 mg/mL concentration, induced 93.3% mortality; on the other hand, with *Hyalomma dromedarii*, there was 93% mortality using doses as high as 10 mg/mL (Hassanain et al. 1997). Another report indicated that *B. thuringiensis kurstaki* at a concentration of  $10^6$  spores/mL was toxic to engorged *Ixodes scapularis* larvae, with an  $LC_{50}$  of  $10^7$  spores/mL (Zhioua et al. 1999). *Ornithodoros erraticus* ticks artificially fed a mixture of *B. thuringiensis* spores and blood had a 100% mortality rate (Samish and Rehacek 1999). *Bacillus thuringiensis* strains reached up to 80% mortality in engorged female *R. microplus* ticks at a concentration of 1.25 mg/mL 15 days after challenge (Fernández-Ruvalcaba et al. 2010), whereas another trial reported a strain that overexpresses an S-layer protein, which killed 75% of engorged females at a concentration of 300 µg/mL and reached more than 90% inhibition of hatching at 100 µg/mL (Lormendez et al. 2019). The differences in the lethal effect of *B. thuringiensis* strains compared to *Serratia* sp. on *R. microplus* could be because *Serratia* sp. is considered to be an opportunistic pathogen (Mahlen 2011), meaning that it becomes pathogenic when the immune system of the host is weakened. This species even manages to evade the immune response by blocking the expression of genes that encode antimicrobial peptides or enzymes, such as phenol oxidase (Raymann et al. 2018), that act as part of the innate immune system to prevent the invasion of pathogens in invertebrates.

Despite the problem that *R. microplus* represents for the livestock industry, biological control studies using bacteria are very limited. In this work, the effect of *Serratia* sp. on larval ticks and engorged female ticks is described for the first time. Analysis of the metabolites produced by this bacterium is required to identify the possible mechanisms of action on ticks. More studies on biocontrol agents against *R. microplus* ticks are needed, which could be used in integrated control programs.

## Conclusion

*Serratia* sp. isolated from a dead *R. microplus* tick showed an ixodicidal effect of up to 50% against larval ticks and engorged females under in vitro conditions. To the best of our knowledge, this report is the first to describe a lethal effect of *Serratia* sp. on *R. microplus*.

**Acknowledgements** The authors gratefully acknowledge CONACyT (National Council of Science and Technology) for the scholarship granted to Edgar Castro Saines for his doctorate degree (CVU No. 811487). We also acknowledge Casandra Flores Neri and M.Sc. Francisco Martínez Ibañez for their technical assistance. This work is part of a PhD thesis.

**Author contributions** ECS: Methodology, Writing—original draft, Visualization. GPC: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing—Review & Editing, Supervision. RHO: Resources, Writing—Review & Editing, Funding acquisition. RLQ: Resources, Funding acquisition.

**Funding** The project was partially financed by the National Institute of Agricultural and Livestock Forestry Research (SIGI No. 10533234452) granted to Dr. Rodolfo Lagunes-Quintanilla.

**Data availability** The material and data sets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Andreotti R, de Pérez LAA, Down SE, Guerrero FD, Bendele KG (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through taq-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol* 11:6
- Bozhokina ES, Tsaplina OA, Efremova TN, Keвер LV, Demidyuk IV, Kostrov SV, Adam T, Komisarschik YY, Khaitlina SY (2011) Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolyzing metalloproteases grimeylsin and proteolysis. *Cell Biol Int* 35(2):111–118
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros E, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64(12):4965–4972
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41:423–431
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21:91–97
- Cheng T, Saidin J, Danish-Daniel M, Gan H, Mat Isa M, Abu Bakar M, Ismail N (2018) Genome sequence of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* strain K27, a marine bacterium isolated from sponge (*Haliclona amboinensis*). *Genome Announc* 6:e00022–e00118
- Clements T, Ndlovu T, Khan S, Khan W (2019) Biosurfactants produced by *Serratia* species: classification, biosynthesis, production and application. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(2):589–602
- Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory test of insecticides. *J Econ Entomol* 66(1):130–133
- Dunstand-Guzmán E, Peña-Chora G, Hallal-Calleros C, Pérez-Martínez M, Hernández-Velázquez VM, Morales-Montor J, Flores-Pérez FI (2015) Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*. *Parasit Vectors* 8:285
- Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Romo-Martínez A, Hernández-Velázquez V, Bravo A, Pérez D (2010) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *J Insect Sci* 10:186
- George JE, Pound JM, Davey RB (2004) Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129:S353–S366
- Hackman RH (1982) Structure and function in tick cuticle. *Ann Rev Entomol* 27:75–95
- Hassanain MA, El Garhy FM, Abdel-Ghaffar AF, El-Sharaby A, Abdel Megeed NK (1997) Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. I. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties on soft and hard ticks (Ixodidae). *Parasitol Res* 83:209–213
- Hertle R (2005) The family of *Serratia* type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci* 6:313–325
- Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Sekimizu K (2014) *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. *J Biol Chem* 289(9):5876–5888
- Jeong H, Mun H, Oh H, Kim S, Yang H, Kim I, Lee H (2010) Evaluation of insecticidal activity of a bacterial strain, *Serratia* sp. EML-SE1 against diamondback moth. *J Microbiol* 48(4):541–545
- Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129:S3–S14
- Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS (2006) Larval immersion test with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 142:386–390
- Kwak Y, Khan AR, Shin JH (2015) Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. *J Biotechnol* 193:1–2
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol* 132:1–41
- Li P, Kwok AHY, Jiang J, Ran T, Xu D, Wang W, Leung FC (2015) Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLoS ONE* 10(4):e0123061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123061>
- Lormendez C, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez V, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramirez G, Lina-Garcia L, Peña-Chora G (2019) Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* 9:17586
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS, Soares CA (2015) Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genet Mol Biol* 38(4):477–483
- Mahlen SD (2011) *Serratia* infections: from military experiments to ocurent practice. *Clin Microbiol Rev* 24(4):755–791

- Matsumoto K (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* 385:1007–1016
- Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol L, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villareal A (2021) *Serratia sp.*, an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematocidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203:549–559
- McQuade R, Stock SP (2018) Secretion systems and secreted proteins in Gram-negative entomopathogenic bacteria: their roles in insect virulence and beyond. *Insects* 9(2):68. <https://doi.org/10.3390/insects9020068>
- Núñez-Valdez ME, Calderón MA, Aranda E, Hernández L, Ramírez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, del Gutiérrez MC, Villalobos FJ (2008) Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl Environ Microbiol* 74(3):802–810
- Pineda-Castellanos ML, Rodríguez-Segura Z, Villalobos FJ, Hernández L, Lina L, Núñez-Valdez ME (2015) Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* toward larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). *Pathogens* 4:210–228
- Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S (2009) Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* 89(4):382–387
- Raymann K, Coon K, Shaffer Z, Salisbury S, Moran N (2018) Pathogenicity of *Serratia marcescens* strain in honey bees. *Mbio* 9(5):e01649–e01718. <https://doi.org/10.1128/mBio.01649-18>
- Rodríguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol Res* 117:3–29
- Samish M, Rehacek J (1999) Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* 44:159–182
- Soufiane B, Cote JC (2009) Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S RNA gyrB and aroE gene sequence analyze. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:33–45
- Veliz EA, Martínez-Hidalgo O, Hirsch AM (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiol* 3(3):689–705
- Zhioua E, Heyer H, Browning M, Ginsberg HS, LeBrun RA (1999) Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* variety *Kurstaki* to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 36(6):900–902

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GUADALUPE PEÑA CHORA** | Fecha:2022-09-21 07:51:14 | Firmante

eY5fGxy7h4P1r15aLwrVo4cxQc9Ly3d/S1Zlv60kOEMplD+Gsum30hsv7Cp6qa/+depzoZnsUGAtoiSMEdcbylEI2sMYmI78hGMSYnmq0Ye3EXS164QybSYLd66cPu5kuFJlk2t9OPT  
OWXL4ih6mJjoi5cdDhdnDN3iPI+VWv+omRWRn4yZcQqvYsQLFc71GdwA9zPII4tES8lppqhw8tTn2D7eaLUTXAoRmHmuAxTHKgXoeL8zbhZqjA2xDza9Ev4w31yoVE537cX4F+a8  
o+7bNBEZnwwGGXn8iRpBoh4CkAUxtWs6yEhBoE+SCsyL0jlaM8uxUa2HIOCI6CXw12rgw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[43F9sgNfS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qCL5iTkTVrGbMk4ypYJllbQpA7ck70ki>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DRA. MARIANA PEDERNEIRA ROMANO**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIANA PEDERNERA ROMANO** | Fecha:2022-09-26 11:56:05 | Firmante

D/Fy8zT3nS3MZuAZ4ZA099Qbw5QURtbdQHBqHXirC+1rCGQ9zfh1NI3bFr0YLP5hs50uToxIntRfmp7h6hivfcDP3sOxEs1cP2CFDIqC2+KRYaT3tcYy7+X1/Cuuk2+Nq/uOMkbLH  
HVRFP8wwm7axQmnA/vgyCr6h/21TEEnroYlSdACijHhVyotDepF0cem6evCtDT3cHj4ERUPyzD6AxUH30q9QHDPMS3q+cXTOW4RO5AXI/9EhFV0doysvwn8qz2a8JkmBf5LjW  
4m1jfP9aeOqL/iIOkvET8g7MAOh7k523RCggVKw51IDNTtoEvuOVbDE2bBMLUfe5U0/Yw8nA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[WqvjdAhC3](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wg5RtlkAtHcYeIRqj82AolQgujfGDq5J>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. FERNANDO IVÁN PÉREZ FLORES**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**FERNANDO IVAN FLORES PEREZ** | Fecha:2022-09-23 12:18:44 | Firmante

cCTWOKRZ0/dqAdv7RQ/qesBHxk6ya+3RDxB3F/nMpsvQ6IYOTxxbkafpEtn9WFA+qxdaUcBOhO7/AfSY3lb5QMvtf9GHPUFyz1n+t7E14x5yDVR1sSnT6gprryGDA3Wp8EqEmRg  
tbkl3hHOUHR2WE4xJuh0m4AnBroO2vcPVimGhn1Lz+ycP06PhVqze7lyHrw1e1+4QKYtSfx6Xs1ILtJudoCN/8AWibOU453ey/y6RLUVma4+fXd8DnsgrEr5M81YzicsPmrow1DUBc  
NFiyPRmj2AZt1zhFtoKEhShsHxEKBpxgZl81RAAzDhrJD/M1lkwuNniwhmCzGsD1si09g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[eans8lcH1](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/afGYmmZMXhSB8SE7kNyYmamu1GHSddSo>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. VIRGINIO AGUIRRE FLORES**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VIRGINIO AGUIRRE FLORES** | Fecha:2022-09-21 08:38:40 | Firmante

KaT+hn1i9sHBZMIXuPhyc+S6LFPOxWi7L1RMIU3B50VoJmp6ytwaqEtm94AwmnaV3mWmNMfc3LDP1urtLh3srDFvN0MkadAvqkxFz3n7ZzrVTqUjFo9deguihGKOtZAuelmGmoChzvrl13MkW5iyMzQ4LEUsSR9Gpvuj9xOqIRNFViVgxXybG4YPxg/yH20Try78R80eMijKEf9fsBxVA3rAG5SHjXkCLGk6H1oYFOjv+zFiGFclz83BFsypHPqP9a4eZRc4Evoi8Dz9hMVgfiMFfnXO8W3RyxJEnzkGN65ATaym0IRg1nRCBbE0GkESptBYUWLSyhz0L0tQCKj5w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[1QNsJqPii](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nJDluzBMI6PnheXxkjJxMpDJQaM82Rh0>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DR. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ** | Fecha:2022-09-21 09:44:04 | Firmante

mm5j4zPJTH7TE3bHZ8Z3CR+3Cgu9VkBJe/sskJ9Tn5hqHPV664O6UYEt3y7t/IW1VBL7S21SOTnQjj7jeKaA2VfeCdzgKIHTGrCrVqvD3lZPsMttZsCuSaWwBFer5NGpa5Apt6Op  
DP1c1GEHuDXKED22mgjuahqDkmbIH4uPYTNLRdV+JWjxjq2C6aJLNxFZRrA8lxymbp0lv/gmRIsWJ+vR7QHcSt3C5787KZiLnI89Zqkq1u5hpuUe0SQpxb4mklptc4hZLjeroyaPN  
LG05Vtx4GPaiAqllgurde/AAI9diKhs/jWgn1G0KL+/8MKiSsT1TjBnoGUWEmj2/vw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[nq6SgR4Tm](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jUXa6VFVO1xJGN8xPV5CGUPbISzMvSYW>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DRA. EVA VIANEY ALQUISIRA RAMÍREZ**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**EVA VIANEY ALQUISIRA RAMIREZ** | Fecha:2022-09-21 16:39:02 | Firmante

Q9wEwJ/R+/SS0jnz/2fYL1KZQ18TtURW0UUed6zaVV7mzQDZZzsWZc+47LGwIFioX9EO4ZIIYKbpUkFnYolDrX74QxMr+z1BYEShYcItM9qV0DI3kyQUhjUclDQuDBWtQ7G5d  
WWxozUbcbsYyTRFx5i3xdDhd6wXISQdTFeWNsPm3yslXrshGaZ17LtAvCKasbdrMWBDMVHzQEOhYXitJ3mSjr9TPk/9gCPPH9L5hxD0jsCDILzlykdaYqJb8pzxOfB43ATVzrZZo  
aKW3yXdx91nLqTX/CGezF3Yt/SqXcv2W5QFUrX4Gg8EKgtE3lVrUDL93zdLE61wYcLcBVKQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[NconWymi9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Uo1GleqrJTWf1zTFbeGp5zRXXF0urdXG>





Cuernavaca, Morelos, 21 de septiembre de 2022.

**Asunto:** Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS.**  
**P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*”** que presenta el: **M. en C. EDGAR CASTRO SAINES**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO**  
**Comité Evaluador**

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209  
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LILIANA AGUILAR MARCELINO** | Fecha:2022-09-21 14:48:26 | Firmante

Zs8ANujjE/1LTwQR2wXCGNNKmO/MW2e189tYCvdZ+c2XBPJf0cq6sXmtGzJJU0i0S7AIMW3MO1xbLm2bTHJ7ONlbrgH37zfAeO5JE8fp8IUf73/Y3q9tYDgBHfXYpainY7IkehNAtbMEll0yLgkmy10jq/Nr5itOFFQXDuvq85J2q+zE+WQ5akNXnXvuWm5+JHO4n4DYdUneAzVaumBrfV5/31A4YEglZdaFxyLLsNdmizhVPKD4RGEs9TTLxUoz3hQlvEltohTwi7fenfRhZsgr/HdELWn6X2r57e7bpe4FoPhA0S0jSOOij38QyTl4uOiwaaCiVW/SCFVUcnsW==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[I9qKzO8nX](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dmv5Mli7bpiguMyeX7sRoo9gzNcM1zP4>

