

Área de Ecología Aplicada

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE COLEÓPTEROS Y LEPIDÓPTEROS

DETRITÍVOROS Y EVALUACIÓN, *in vitro*, DE SU EFECTO ANTAGÓNICO EN UNA CEPA DE *Fusarium oxysporum*.

ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM DETRITIVORE COLEOPTERA AND LEPIDOPTERA LARVAE DIGESTIVE TRACT AND EVALUATION, *in vitro*, OF ANTAGONIC EFFECT ON A *Fusarium oxysporum* STRAIN.



Juan David Galvis Salazar¹

Roberto Quiñones D. Diplom biologie^{2, 4}

Pedro Jiménez Ph.D³

Recibido el 16 de septiembre de 2009

Aceptado el 16 de octubre de 2009

1. Estudiante Programa Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
2. Laboratorio de Ecología, Docente Programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
3. Laboratorio de Fitopatología, Docente Programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
4. Autor para correspondencia: joaquin.quinones@unimilitar.edu.co

RESUMEN

La información disponible acerca de las relaciones simbióticas entre microorganismos endosimbióticos e insectos es escasa, dentro de lo cual los organismos detritívoros son de gran importancia en la formación del suelo, ciclado de nutrientes y descomposición de materia orgánica. Por ello estudiar las relaciones de insectos detritívoros y microorganismos simbióticos, es interesante por su potencial uso en el campo agrícola y su aplicación biotecnológica. Para ello, a partir de estudios de varios autores se estandarizó un protocolo de disección del tracto digestivo de larvas de coleópteros y lepidópteros detritívoros. Así se aislaron ocho morfotipos de bacterias del tracto digestivo de una morfoespecie de coleóptero (familia: Scarabaeidae) y cuatro morfotipos de bacterias y tres de levaduras del tracto digestivo de un lepidóptero (familia: Noctuidae). Por su potencial aplicación, se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* de estos aislados sobre *Fusarium oxysporum*. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con una bacteria extraída del coleóptero. Sorpresivamente se obtuvieron dos bacterias que promovían el crecimiento de *F. oxysporum*, una extraída del coleóptero, y otra del lepidóptero. Este trabajo deja bases para realizar futuras investigaciones acerca de las relaciones simbióticas entre larvas de insectos detritívoros y sus microorganismos, y las posibles futuras aplicaciones en la agricultura.

Palabras claves: simbiosis, detritívoro, coleóptero, lepidóptero, antagonismo.

ABSTRACT

Available information about the symbiotic relationships between endosymbiotic

microorganisms and insects is scarce. In this context, detritivorous organisms are of great importance in soil formation, decomposition of organic matter and nutrient cycling. Due to these facts, and its potential use in agrobiotechnology, studying the relationships of symbiotic microorganisms and detritivore insects is a matter of interest. Based on literature we standardized a protocol for dissecting the digestive tract of detritivorous beetles and moth larvae. Eight bacteria morphotypes were isolated from the beetle larva (Family: Scarabaeidae) and four morphotypes of bacteria and three yeast morphotypes, were isolated from a lepidopteran larva (family: Noctuidae). To explore their possible use as antagonist organisms, *in vitro* tests were performed co-cultivating those with a *Fusarium oxysporum* isolate. The largest inhibition percent was obtained with a bacterium extracted from the beetle. Unexpectedly, two bacteria promoted *F. oxysporum* growth, one taken from the beetle and other from the lepidopteran. These results state bases for future research on symbiotic relationships between insect detritivore larvae and microorganisms, and its possible future applications to agriculture.

Key words: symbiosis, detritivore, coleoptera, lepidoptera, antagonism.

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado, se ha venido estudiando la simbiosis existente entre microorganismos endosimbióticos y animales (Suh *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2005). Sin embargo, el conocimiento acerca de este tipo de interacciones es aun muy poca (Nardi *et al.*, 2006).

Estudios realizados con larvas de coleópteros han demostrado que hay un alto número de especies de bacterias y levaduras presentes en su tracto digestivo, representando un potencial muy importante para la biotecnología (Boekhout, 2005). Estos microorganismos, y los presentes en lepidópteros fitófagos, facilitan la digestión de compuestos presentes en las plantas (Rio *et al.*, 2003; Schloss *et al.*, 2006; Berkov *et al.*, 2007; Pinto-Tomás *et al.*, 2007; Pittman *et al.*, 2007; Khiyami & Alyamani, 2008; Vasanthakumar *et al.*, 2008). Estas especies pudieron haber permitido la diversificación de estos grupos de insectos, en ambientes pobres en solutos, al conferirles la capacidad de aprovechar recursos de otra manera inaccesibles (Suh *et al.*, 2005). A modo de ejemplo, muchas de las levaduras (en su mayoría *Saccharomycetes*) descritas por estos autores intervienen en la digestión de xilosa y hemicelulosa en el intestino de estos insectos, que en caso contrario no podrían ser utilizadas como recurso alimenticio (Suh *et al.*, 2003; Suh & Backwell, 2004). Así mismo, varios estudios han descrito una población bacteriana (compuesta de *Lactobacillus* y *Enterocacteriaceae*, entre otros) presente en el tracto digestivo de coleópteros que se encargarían de facilitar procesos de digestión de sustratos como celulosa y compuestos lignocelulósicos (Barbeiro *et al.*, 2001; Lemke, 2003; Andert, 2007; Lundgren *et al.*, 2007; Lehman *et al.*, 2009).

De manera análoga, los organismos detritívoros, aquellos que se alimentan de materia orgánica en descomposición (Amat-García *et al.*, 2004), requieren de microcomunidades en el tracto digestivo, compuestas generalmente de bacterias y hongos (levaduras y otros

ascomycetes), que permiten la absorción de ciertos nutrientes. El degradar los compuestos que sus hospedadores son incapaces de digerir, indica que los microorganismos presentes en el tracto digestivo de dichos animales también juegan un papel importante en la digestión de la materia orgánica (Boekhout, 2005; Nardi *et al.*, 2006).

En los agroecosistemas, la biodiversidad puede ser clasificada según el papel que juega cada organismo en la actividad agrícola. Así los detritívoros y sus simbioses, pueden caer en la siguiente clasificación: biota productiva (animales, plantas y cultivos de importancia), biota destructiva (pestes, malezas, patógenos, etc.) y la biota recursiva (organismos que contribuyen con la productividad por medio del control biológico, la descomposición de materia orgánica, la polinización, etc.) (Swift & Anderson, 1993, citado por Altieri & Nicholls, 2004).

Por otra parte, los invertebrados detritívoros juegan un importante papel en el mantenimiento de los suelos, junto a otros miembros de la edafofauna, al intervenir en el ciclo de nutrientes. Al alimentarse de materia orgánica en descomposición por medio de sus procesos digestivos, la transforman en sustratos posteriormente usados por otros organismos para su nutrición (Label & Spain, 2005; Begon *et al.*, 2006; White, 2006).

Las relaciones entre microbios e invertebrados detritívoros se deben considerar un factor importante en el sostenimiento del suelo. Además debido a las posibles aplicaciones de los microorganismos simbióticos en la agricultura (ya sea en el mantenimiento del suelo, o en el control microbiológico de plagas y enfermedades), esta microbiota requiere

ser reconocida (Boekhout, 2005; Nardi *et al.*, 2006). El estudio del tipo de microorganismos presentes en el tracto digestivo de insectos detritívoros, se convierte en el primer paso para la realización de estudios de exploración de la edafofauna y de inventarios preliminares de microorganismos.

En este trabajo exploratorio se aislaron los microorganismos presentes en el tracto digestivo de larvas de dos especies un coleóptero y un lepidóptero, ambos detritívoros. También, se evaluó el posible efecto antagónico contra *F. oxysporum*, con el fin de generar bases para futuras investigaciones acerca de las microcomunidades presentes en los tractos digestivos de estos invertebrados, durante sus diferentes etapas de vida, las relaciones simbióticas que estos presentan y los posibles usos de estos organismos en la agricultura.

METODOLOGÍA

Obtención de las larvas

La colecta de las larvas de insectos se planeó inicialmente obtenerlas de acumulaciones "artificiales" materia vegetal (Flores y Quiñones, 2009), sin embargo las condiciones climáticas no facilitaron la colonización de coleópteros por lo que las larvas de coleópteros, de la familia Scarabaeidae, se colectaron en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, bajo lozas sobre suelo rico en materia orgánica.

Las larvas de lepidópteros detritívoros, de la familia Noctuidae, sí se capturaron a través de canastas de malla llenas con 2 Kg de kikuyo en descomposición. Localizadas en el campus de la UMNG sede Cajicá (Cundinamarca), las que se siguieron cada semana durante dos

meses. Se colectaron individuos de una morfoespecie de lepidóptero, incluida en la colección de referencia de detritívoros de canastas (Flórez. M, comunicación personal).

Las larvas colectadas se mantuvieron a temperatura ambiente en recipientes plásticos con suelo y sustrato hasta su disección a las tres y dos semanas, respectivamente.

Extracción del tracto digestivo de las larvas

El sacrificio de las larvas se realizó por enfriamiento, manteniéndolos durante cinco minutos en nevera a 4°C, antes de ser utilizados. Los especímenes ya sacrificados fueron sometidos a desinfección de la superficie sumergiéndolos en etanol 95% por dos minutos en el caso de la larva de coleóptero y un minuto para la larva de lepidóptero. Posteriormente a esto fueron sumergidos en solución salina al 0.7% (Suh *et al.*, 2003, Suh & Bakwell 2004, Suh *et al.*, 2004). Esto se le realizó a un solo individuo de cada morfoespecie.

Los especímenes fueron colocados en una caja de Petri con una superficie de cera negra sobre la cual se realizó la disección, usando tijeras para microcirugía, y agujas de insulina para realizar los cortes ventrales. Con la aguja de insulina se realizaron cortes transversales en la zona anal y en la zona cefálica. Luego, se realizó un corte longitudinal con las tijeras. El tracto digestivo fue extraído cortando las dos extremidades del mismo con el fin de separarlo del individuo (Vasanthakumar *et al.*, 2006; Vasanthakumar *et al.*, 2008).

El tracto digestivo se introdujo en un microtubo eppendorf con 0,2 mL de agua peptonada al 10% y se agitó en el vortex por 30s para

separar los microorganismos de las paredes del tejido (Schloss et al., 2006; Vasanthakumar et al., 2006). Luego, esta muestra se inoculó sobre Agar Papa Dextrosa (PDA) ½ concentración y Agar Nutritivo (AN) ½ concentración y se incubó por 24h a 28°C.

Purificación de los organismos aislados

Las colonias obtenidas del cultivo anterior, se sembraron en AN ½ concentración y en PDA ½ concentración dependiendo del medio de donde se extrajeron, por aislamiento y se incubó por 28h a 28°C.

Los aislados obtenidos fueron caracterizados como levaduras o bacterias realizando observaciones al microscopio; las bacterias se sometieron a tinción de Gram, mientras que las levaduras se observaron directamente al microscopio.

Los microorganismos aislados y caracterizados, se purificaron tomando de nuevo una colonia aislada de las muestras. Las bacterias fueron sembradas en caja maestra con AN ½ concentración y las levaduras en PDA ¼ concentración.

Pruebas de antagonismo

Se realizaron pruebas de antagonismo a *Fusarium oxysporum* con cada uno de los microorganismos aislados en el estudio, de la siguiente forma (Fig. 1):

Se trabajó con dos de estos montajes por microorganismo aislado y con cuatro montajes control, los cuales poseían solo el inóculo de *F. oxysporum*.

Los montajes se dejaron a temperatura ambiente (12-28°C) por 12 días y se midió el anillo de crecimiento de *F. oxysporum*. Las medidas tomadas por cada tratamiento fueron promediadas.

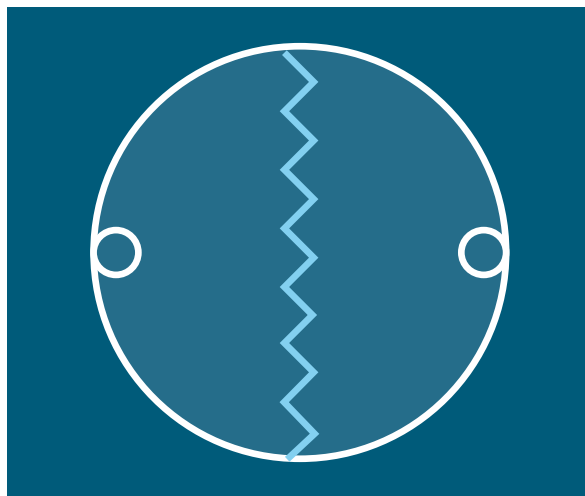


Figura 1. Se insertó en los dos extremos el inóculo de *F. oxysporum* (círculos) y en el medio de la caja se sembró el microorganismo aislado

Tomando como 100% el promedio de crecimiento del tratamiento control, que tenían solo *F. oxysporum*, se calcularon los porcentajes de crecimiento del hongo. A partir de estos datos se estimó el porcentaje de inhibición como se muestra en la figura 2.

RESULTADOS

Se capturaron tres individuos del morfotipo de lepidóptero (Familia Noctuidae) por medio de las trampas, y tres del morfotipo de coleóptero (Familia Scarabeidae) en el municipio de Mosquera Cundinamarca. De estos organismos capturados se utilizó un individuo de cada morfoespecie. En total se aislaron ocho microorganismos por parte de la morfoespecie de coleóptero y siete de la morfoespecie de lepidóptero.

En el caso de las bacterias, la tinción de Gram mostró que todas las bacterias aisladas eran Gram negativas. Del coleóptero se aislaron ocho morfotipos de bacterias, mientras

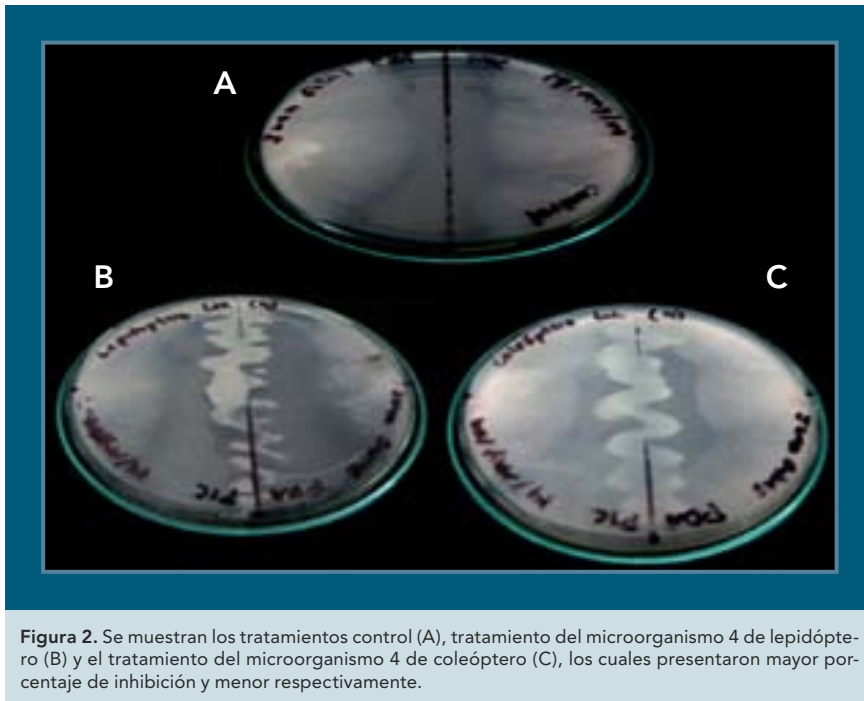


Figura 2. Se muestran los tratamientos control (A), tratamiento del microorganismo 4 de lepidóptero (B) y el tratamiento del microorganismo 4 de coleóptero (C), los cuales presentaron mayor porcentaje de inhibición y menor respectivamente.

crecimiento más rápido que el observado para el control sin microorganismos. La bacteria #4C presentó el menor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium*, mientras que la levadura #4L presentó un porcentaje de inhibición del 19% (Figura 2).

DISCUSIÓN

En el estudio se observó que en la muestra de coleópteros (Scarabaeidae), solo se aislaron bacterias y no levaduras,

que en el caso del lepidóptero se aislaron, cuatro morfotipos de bacterias, y tres de levaduras (Tablas 1 y 2).

lo cual permite suponer en que la metodología usada en este morfotipo no permitió extraer

Pruebas de antagonismo

En un ensayo de antagonismo *in vitro*, se determinó el porcentaje de crecimiento de un aislado de *F. oxysporum* tomando como referencia el tratamiento control (sin microorganismos) como el 100% y apartir de este se calculó el porcentaje de crecimiento presente en los demás tratamientos (figura 3).

Dos bacterias, promovían el crecimiento de *F. oxysporum*, produciendo un

Coleóptero (Scarabaeidae)			
Microorganismo	Gram	Descripción de la colonia	Descripción microscópica
#1C	(-)	Colonias color blanco de consistencia cremosa, colonias circulares, de elevación plana y bordes lisos	Diplococos
#2C	(-)	Colonias blancas, circulares, cremosas, bordes lisos, colonia en elevación convexa	Cocos
#3C	(-)	Colonias blancas cremosas, elevada, colonias circulares de borde lisos.	Cocos
#4C	(-)	Colonias blancas de consistencia seca, colonias circulares de crecimiento elevado de bordes lisos.	Cocos
#5, #6, #7, #8 C	(-)	Colonias color crema, consistencia seca, colonias circulares y de elevación convexa con bordes lisos.	Cocobacilos

Tabla 1. Descripción de los microorganismos aislados del tracto digestivo de la morfoespecie de coleóptero

otro tipo de microorganismos del tracto digestivo, ya que los estudios realizados hasta el momento en varios coleópteros diferentes, ya sea larvas (Berkov *et al.*, 2007) o adultos (Suh *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2005), siempre se detectó la presencia de levaduras en el tracto digestivo.

Todas las bacterias aisladas del coleóptero (Scarabaeidae) fueron bacterias Gram negativas, lo cual tiene sentido a la luz de lo descrito en estudios con larvas de lepidópteros fitófagos. Los grupos de bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de estas larvas fitófagas, se agrupan en enterobacterias y bacilos Gram positivos. Al considerar el tipo de alimentación detritívora del morfotipo

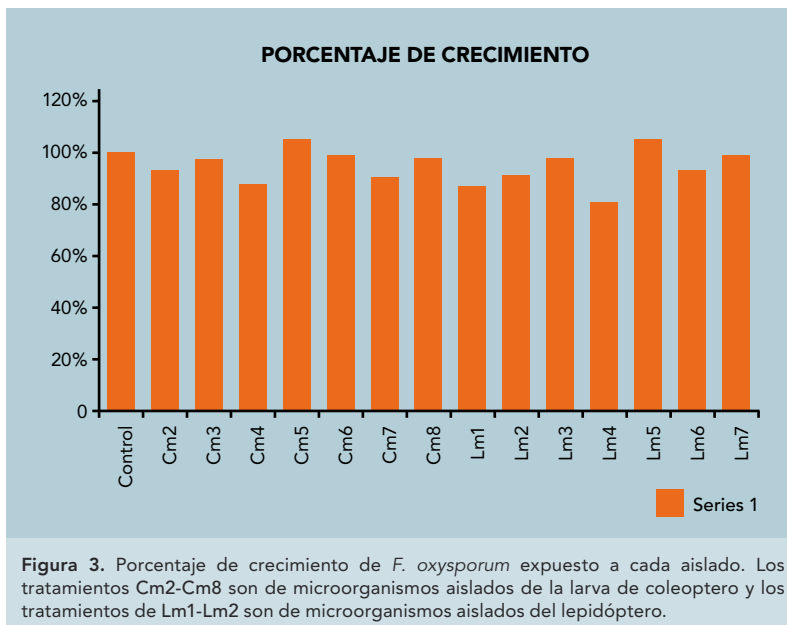
de coleóptero que se estudió podría explicar por que se encontraron bacterias Gram negativas y no Gram positivas. Estas ultimas poseen actividades enzimáticas muy marcadas, pues muchas de las enterobacterias poseen actividades gelatinolíticas, caseinolíticas, esterásicas, lipolíticas y quitinolíticas, mientras que las Gram positivas, muestran actividades amilásicas, celulolíticas y xilanolíticas (Pinto-Tomás *et al.*, 2007).

En el caso del morfotipo del lepidóptero (Noctuidae), se aislaron tres morfotipos de levaduras, y cuatro de bacterias. Investigaciones realizadas hasta el momento encontraron la presencia de bacterias en el tracto digestivo de lepidópteros, las cuales jugarían un pa-

papel importante como se explicó anteriormente en la alimentación de estos insectos (Schloss *et al.*, 2006; Vasanthakumar *et al.*, 2006; Khiyami & Alyamani, 2008; Sanchez-Contreras & Vlisidou, 2008). Estas bacterias, al igual que sucede en el caso del coleóptero, son Gram negativas. Tener en cuenta los resultados encontrados con respecto al coleóptero, invita a pensar que en los animales detritívoros hay presencia de bacterias Gram

Lepidóptero (Noctuidae)			
Microorganismo	Gram	Descripción de la colonia	Descripción microscópica
#1L		Colonia de color amarillo casi transparente y de crecimiento plano y consistencia seca	Levadura
#2L	(-)	Colonia de color amarillo de crecimiento plano y consistencia seca y colonias puntiformes	Diplococos
#3L	(-)	Colonia color amarillo brillante, colonias puntiformes, crecimiento convexo y consistencia seca	Bacilos
#4L		Colonia de color blanco, de colonias circulares, crecimiento convexo y consistencia viscosa	Levadura
5#L	(-)	Colonia color amarillo de crecimiento plano, consistencia seca y colonias puntiformes	Bacilos
6#L		Colonia de color rojo y consistencia viscosa, colonias circulares y bordes lisos y elevación convexa	Levadura
7#L	(-)	Colonia color naranja y consistencia mucoi-de, bordes lisos, elevación convexa, colonias circulares	Bacilos

Tabla 2. Descripción de los microorganismos aislados del tracto digestivo de la morfoespecie de lepidóptero.



negativas y que estas, juegan un papel muy importante en la asimilación de nutrientes a partir de los detritos.

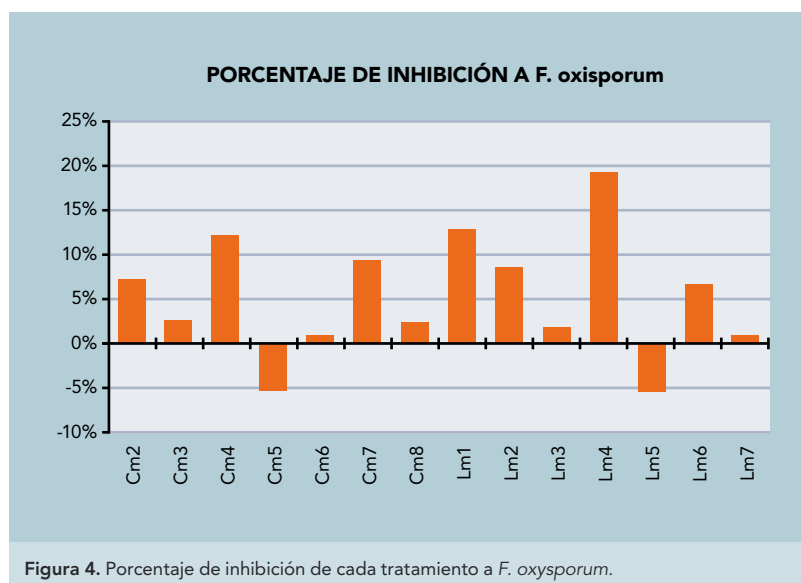
En adición a esto, se puede pensar que en el morfotipo de lepidóptero estudiado también sea necesario el uso de levaduras para la degradación de diferentes compuestos presentes en el alimento que estos consumen al igual que los insectos estudiados en varios de los trabajos citados en este estudio (Suh et al., 2003; Suh et al., 2004; Suh et al., 2005), y posiblemente la diferencia marcada entre los resultados obtenidos en ambos morfotipos (coleóptero y lepidóptero) sea debido a que los detritos que estos consumen no son los mismos.

Pruebas de antagonismo

En las pruebas de antagonismo *in vitro*, ninguno de los microorganismos aislados inhibió marcadamente el crecimiento de *F. oxysporum*.

El microorganismo que presentó mayor porcentaje de inhibición fue la levadura #4 del aislado de lepidóptero, donde se observó solo un 19% de inhibición. Aunque estas pruebas no muestran valores altos de inhibición (por ejemplo mayores a 40 o 60%), se presentan como una de las posibles aplicaciones que se pueden asociar a este tipo de microorganismos.

De manera interesante y sorpresiva hubo dos morfotipos de bacterias aisladas que promovieron el crecimiento de *Fusarium*



oxysporum en nuestras condiciones experimentales, mostrando porcentajes de inhibición de -5 y de -6%.

Los resultados obtenidos resultan satisfactorios, ya que si fue posible aislar microorganismos del tracto digestivo de larvas de coleópteros y lepidóptero detritívoros por medio del protocolo usado, lo cual coloca una base sobre la cual se pueden realizar futuros estudios acerca de las interacciones que presentan microorganismos e invertebrados detritívoros. Incluso se puede pensar en ensayos de consorcios con actividad antagonista. Estos estudios pueden eventualmente conducir al descubrimiento de organismos con enzimas involucradas en la degradación de compuestos orgánicos del suelo, que tengan aplicaciones industriales como celulasas y quitinasas, además de antagonismo y control microbiológico de enfermedades del suelo.

CONCLUSIONES

Con el protocolo usado en este trabajo es posible aislar microorganismos presentes en el tracto digestivo de los morfotipos estudiados de coleópteros y lepidópteros detritívoros.

Ninguno de los microorganismos evaluados posee un porcentaje de inhibición al crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro* mayor del 20%, incluso dos morfotipos de bacterias promueven el crecimiento.

Este trabajo deja bases para realizar futuras investigaciones acerca de las relaciones simbióticas entre larvas de insectos detritívoros y los microorganismos, y su posible uso como consorcios antagonistas en agricultura.

AGRADECIMIENTOS

- A la vicerrectoría de investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada (UMNG), por la financiación del proyecto de iniciación PICCIAS 434.
- A los miembros del laboratorio de fitopatología y de ecología de la UMNG, por el apoyo tanto logístico como académico brindado.
- A los compañeros de curso del primer autor que ayudaron en varias de las actividades realizadas en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Altieri. M.A., C.I. Nicholls. 2004. Biodiversity and pest management in agroecosystems, second edition. Food products press, New York.
2. Amat-García. E.; G. Amat-García, Henao-M. L. 2004. Diversidad taxonómica y ecológica de la entomofauna micófaga en un bosque altoandino de la cordillera Oriental de Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc., 28(107): 223-231.
3. Andert. J. 2007. Transformation of nitrogenous soil components by humivorous beetle larvae. Phillips-Universitat Marburg. [<http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2007/0692/pdf/dja.pdf>]
4. Barberio. C., F. di Cello, Chelazzi. L., I. Colombini, Fallaci. M., R. Fani. 2001. Molecular and physiological analysis of mesophilic aerobic heterotrophic bacteria from the gut of two species of the genus *Phaleria* Latreille, 1802 (Coleoptera, Tenebrionidae). Annals of Microbiology 51: 95-105
5. Begon. M., C.R. Townsend, Harper. J.L. 2006. Ecology fourth edition. Blackwell Publishing Ltd, Malden, USA.
6. Berkov. A., J. Feinstein, Small. J., M. Nkamany. 2007. Yeasts Isolated from Neotropical Wood-Boring Beetles in SE Peru. BIOTROPICA 39(4): 530-538
7. Boekhout. T. 2005. Gut feeling for yeasts. Nature 443:449-451

8. Flórez P., M.A. y Quiñones D., J.R. 2009. Estandarización de canastas de residuos vegetales como refugio para detritívoros en un pastizal, Cajicá. XXXVI Congreso Nacional SOCOLEN, Medellín, Colombia. Memorias.
9. Khiyami. M., E. Alyamani. 2008. Aerobic and facultative anaerobic bacteria from gut of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). African Journal of Biotechnology 7 (10): 1432-1437
10. Lavelle. P., A.V. Spain. 2005. Soil Ecology. Springer. Netherlands.
11. Lehman R., J.G. Lundgren, Petzke. L.M. 2009. Bacterial Communities Associated with the Digestive Tract of the Predatory Ground Beetle, *Poecilus chalcites*, and Their Modification by Laboratory Rearing and Antibiotic Treatment. Microb Ecol 57:349–358
12. Lemke. T., U. Stingl, Egert. M., W. Friedrich, Brune. A. 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology 69: 6650–6658.
13. Lundgren. J., R. M. Lehman, Chee-Sanford. J. 2007. Bacterial Communities within Digestive Tracts of Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae). Entomol. Soc. Am. 100(2): 275-282
14. Nardi. J., C. Bee, Miller. L.A., H. Nguyen, Suh. S.O., M. Blackwell. 2006. Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a sub-social beetle. Elsevier Ltd. USA.
15. Pinto-Tomás. A., L. Uribe-Lorío, Blanco. J., G. Fontecha, Rodríguez. C., M. Mora, Janzen. D., F. Chavarría, Díaz. J., A. Sittenfeld. 2007. Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). Revista biología tropical 55 (2): 401-415
16. Pittman. G., S. Brumbley, Allsopp. P., S. O'Neill. 2007. "Endomicrobia" and Other Bacteria Associated with the Hindgut of *Dermolepida albohirtum* Larvae. Applied and environmental microbiology 74(3): 762–767
17. Rio. R., C. Lefevre, Heddi. A., S. Aksoy. 2003. Comparative Genomics of Insect-Symbiotic Bacteria: Influence of Host Environment on Microbial Genome Composition. Applied and environmental microbiology 69(11): 6825–6832
18. Sanchez-Contreras. M., I. Vlisidou. 2008. The Diversity of Insect-bacteria Interactions and its Applications for Disease Control. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 25: 203-244
19. Schloss. P., I. Delalibera, Handelsman. J., K. Raffa. 2006. Bacteria Associated with the Guts of Two Wood-Boring Beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). Environmental Entomology 35(3): 625-629
20. Suh. S.O., C. Marshall, McHugh. J., Blackwell. M. 2003. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. Molecular Ecology 12 : 3137–3145
21. Suh. S.O., J.V. McHugh, Blackwell. M. Expansion of the *Candida tanzawaensis* yeast clade: 16 novel *Candida* species from basidiocarp-feeding beetles. 2004. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2409–2429
22. Suh. S.O., J.V. McHugh, Pollock. D.D., M. Blackwell. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. 2005. The British Mycological Society 109 (3): 261–265
23. Suh. S.O., M. Blackwell. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. 2004. Federation of European Microbiological Societies 5: 87-95
24. Suh. S.O., M.M. White, Nguyen. N.H., M. Blackwell. 2004. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. Mycologia 96(4):756–760.
25. Vasanthakumar. A., I. Delalibera, Handelsman. J., K. Klepzig, Schloss. P., K. Raffa. 2006. Characterization of Gut-Associated Bacteria in Larvae and Adults of the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. Environmental Entomology 35(6): 1710-1717
26. Vasanthakumar. A., J. Handelsman, Schloss. P., I. Bauer, Raffa. K. 2008. Gut Microbiota of an Invasive Subcortical Beetle, *Agrilus planipennis* Fairmaire, Across Various Life Stages. Environmental Entomology 37(5): 1344-1353
27. White. R.E. 2006. Principles and practice of soil science, fourth edition. Blackwell publishing. Oxford.