

Instituto Tecnológico De Costa Rica

Escuela de Biología

Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio)

“Estudio de la diversidad de hongos y bacterias asociados al intestino de larvas de coleópteros y determinación de sus propiedades lignocelulíticas”

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Angélica Acuña González

Cartago junio, 2009

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS ASOCIADOS AL INTESTINO DE LARVAS DE COLEÓPTEROS Y DETERMINACIÓN DE SUS PROPIEDADES LIGNOCELULÍTICAS

Angélica Acuña González *

RESUMEN

Es importante comprender el proceso de conversión de la biomasa a azúcares simples y los microorganismos responsables del mismo para poder obtener productos útiles como biocombustibles a partir de la misma. En el presente trabajo se aislaron bacterias y hongos del intestino de larvas de coleópteros y se identificaron mediante marcadores moleculares; además se realizaron ensayos enzimáticos para determinar algunas de sus propiedades lignocelulíticas. Se obtuvieron larvas de cinco familias de coleóptera (Elateridae, Scarabaeidae, Cerambycidae, Passalidae y Tenebrionidae), y se aislaron e identificaron 109 bacterias y 74 hongos del proctodeo de las larvas. Las clases de bacterias con mayor cantidad de individuos fueron Gammaproteobacterias, Firmicutes y Actinomycetales, del total un 20% pudo degradar carboximetilcelulosa (CMC) *in vitro*. En los hongos predominó el orden Hypocreales, y un 47% de los hongos aislados pudo digerir CMC y un 35 % lignina. En este trabajo se comprobó que el intestino de larvas de escarabajos del orden coleóptera constituye una buena fuente para la búsqueda de microorganismos debido a la alta diversidad de especies de hongos y bacterias que posee y se demostró la actividad lignocelulítica presente en gran parte de las bacterias y los hongos aislados.

Palabras Clave: marcador molecular, coleóptera, carboximetilcelulosa, lignina.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

STUDY OF THE DIVERSITY OF FUNGUS AND BACTERIA ASOCIATED TO LARVAE GUTS (ORDEN COLEOPTERA) AND DETERMINATION OF THEIR LIGNOCELULOSIC PROPERTIES

Angélica Acuña González *

ABSTRACT

It is important to understand the process of converting the biomass into simple sugars and the responsible microorganisms of this process in order to obtain value-added products such as biofuels. In the present work, we isolated bacteria and fungus from the hindgut of larvae which were identified using molecular techniques; parallel enzymatic assays were made to determine some of the lignocelulolytic activity from the isolated microbial. Larvae were obtained from five families of coleoptera (Elateridae, Scarabaeidae, Cerambycidae, Passalidae y Tenebrionidae), there were 109 bacteria and 74 fungus isolated and identified from the hindgut of larvae. The dominant classes of bacteria were Gammaproteobacterias, Firmicutes and Actinomycetales, 20% out of that bacteria population was able to hydrolyze carboxymethylcellulose (CMC). In the fungus population, the majority belongs to the Hypocreales order, 47% of the fungus could degrade CMC and 35% digested lignin. This study suggests that the hindgut of larvae (orden: coleoptera) constitutes a potential source to search for microorganisms with enzymatic activity due to the high diversity of species of fungus and bacteria isolated and because most of them show lignocelulolytic activity.

Key words: molecular marker, coleoptera, carboxymethylcellulose and lignin.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
INDICE GENERAL	4
INDICE DE CUADROS	6
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE ANEXOS	9
INTRODUCCIÓN	10
REVISION DE LITERATURA	11
Componentes de la pared celular.....	11
Celulosa y bioconversión.....	11
Hemicelulosa y bioconversión.....	13
Lignina y bioconversión.....	14
Microorganismos con actividad lignocelulítica.....	16
Estudios sobre la microbiota intestinal de coleópteros.....	17
Estimadores de biodiversidad.....	18
OBJETIVOS	20
Objetivo General.....	20
Objetivos específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Colecta de las muestras.....	21
Aislamiento de bacterias y hongos.....	21
Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	22
Distribución de filotipos aislados.....	23
Actividad Lignocelulítica.....	24
Estimadores de biodiversidad.....	24
RESULTADOS	26
Extracción de ADN y PCR.....	26
Distribución de filotipos aislados.....	28
Actividad Lignocelulítica.....	32
Estimadores de diversidad.....	37

DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIÓGRAFIA.....	41
ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1.	Distribución de filotipos de hongos aislados de las familias de coleóptera.	31
2.	Distribución de filotipos de bacterias aisladas de las familias de coleóptera.	32
3.	Especies de hongos con capacidad de degradar lignina y carboximetilcelulosa (CMC)	32
4.	Especies de bacterias con capacidad de degradar carboximetilcelulosa	34
5.	Estimadores ecológicos de hongos y bacterias	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1.	Estructura molecular de la celulosa	12
2.	Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y β -glucosidasa.	13
3.	Estructura molecular de la hemicelulosa y sitio de acción de las enzimas endo- β -xilanasa, α -glucuronidasa, α -arabinofuranosidasa y β -xilosidasa.	14
4.	Estructura molecular de la lignina.	15
5.	Estructura molecular de la lignina y sitio de acción de la lignino peroxidasa.	16
6.	Distribución geográfica de las larvas muestreadas en Costa Rica, con el objetivo de estudiar la microbiota intestinal de las mismas.	22
7.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído a algunas muestras frescas colectadas en diferentes puntos geográficos de Costa Rica.	26
8.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del marcador molecular 16S en bacterias.	27
9.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del marcador molecular ITS en hongos.	27
10.	Promedio de especies de bacteria aisladas por larva por Parque Nacional.	28
11.	Promedio de especies de bacteria aisladas por larva por familia de coleóptera.	29
12.	Promedio de especies de hongo aislados por larva por Parque Nacional.	29

13.	Promedio de especies de hongo aislados por larva por familia de coleóptera.	30
14.	Fotografía de bacterias cultivadas en medio selectivo CMC, los halos alrededor de las colonias indican el CMC digerido por las bacterias, revelado con Rojo Congo.	35
15.	Fotografía de hongos cultivados en medio selectivo CMC, los halos alrededor de las colonias indican el CMC digerido por los hongos, revelado con Rojo Congo.	36
16.	Fotografía de hongos cultivados en medio lignina, el medio oscurecido indica la oxidación de la lignina.	36

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1.	Información de las muestras recolectadas de insectos por cada sitio.	43
2.	Protocolo de extracción de ADN estándar utilizado en los aislamientos de hongos de intestinos de larvas de coleópteros.	44
3.	Protocolo de extracción de ADN estándar utilizado en los aislamientos de bacterias de intestinos de larvas de coleópteros.	45
4.	Componentes del medio Carboximetilcelulosa, utilizado para comprobar actividad enzimática en los hongos y bacterias aislados del intestino de larvas.	46
5.	Componentes del medio Lignina, utilizado para comprobar actividad enzimática en los hongos y bacterias aislados del intestino de larvas.	46
6.	Taxonomía de los hongos aislados de intestinos de larva de coleóptero	47
7.	Taxonomía de las bacterias aisladas de intestinos de larva de coleóptero	49

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fuentes alternativas de energía constituye un reto y una necesidad primordial en nuestra sociedad, específicamente la sustitución del petróleo por combustibles generados a partir de fuentes renovables como la biomasa vegetal, lo cual se plantea como una buena solución debido a que es el recurso natural renovable más abundante de la naturaleza. La conversión de este recurso a azúcares mediante la utilización de microorganismos con capacidad de degradación o por medio de enzimas derivadas de éstos, es altamente deseable debido a que este material podría ser reutilizado para la producción de combustibles como el bioetanol u otros compuestos químicos de interés.

El primer paso para la utilización de biomasa como fuente de energía es la bioprospección de enzimas con capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos, las cuales están presentes en microorganismos del intestino de insectos degradadores de madera, que proveen de los nutrientes que permiten al insecto desarrollarse en este nicho especializado.

Los insectos seleccionados fueron los escarabajos (orden coleóptera) porque crecen y se alimentan a partir de madera en descomposición, su forma de vida es subsocial pues viven en colonias de individuos con generaciones que se superponen, lo que puede promover asociaciones simbióticas con microorganismos, además, que se han propuesto los intestinos de dichos insectos como un hábitat inexplorado para el descubrimiento de nuevos hongos y bacterias con actividad lignocelulítica.

De esta manera el presente proyecto pretende estudiar la diversidad de bacterias y hongos asociados al intestino de larvas de escarabajos que se alimentan de madera pertenecientes al orden coleóptera y determinar sus propiedades lignocelulósicas. La información generada será útil para entender mejor este ecosistema y para la bioprospección de microorganismos y/o enzimas derivadas de estos que puedan ser utilizados para la reutilización de la biomasa vegetal y su conversión a productos útiles a la sociedad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Componentes de la pared celular. La pared celular de las plantas está compuesta por tres principales compuestos que son la celulosa que constituye aproximadamente de un 35% a un 50% del peso seco de la planta cuya principal función es dar rigidez a la pared celular, la hemicelulosa que comprende de un 20 a un 35% y la lignina de un 5 a un 30% la cual es un polímero aromático que forma enlaces covalentes con las fibras de celulosa limitando el crecimiento celular y reduciendo la posibilidad de que la pared celular sea biodegradada (Lynd *et al.*, 2002).

Los sustratos lignocelulósicos naturalmente se encuentran insolubles en la pared celular de las plantas, por lo tanto los microorganismos que se alimentan de ellos deben de usar enzimas extracelulares, que se secretan al medio o se asocian a la superficie celular; éstas enzimas convierten los polisacáridos en productos solubles que son transportados dentro de las células (Warren, 1996).

Debido a la complejidad de la estructura de la planta y de las moléculas que la componen, es necesario que las enzimas involucradas en la escisión de los polisacáridos actúen de manera sinérgica o cooperativa para lograr una eficiente degradación. Este fenómeno ha sido comprobado para los grupos de enzimas que degradan la celulosa, hemicelulosa y la lignina, además se sabe que los microorganismos no tienen la misma cantidad de todas las enzimas implicadas en el procesamiento de la lignocelulosa (Lynd *et al.*, 2002).

Celulosa y bioconversión. La celulosa es el componente de la biomasa de plantas de mayor abundancia en la naturaleza, normalmente se encuentra en las plantas, sin embargo también es producido por algunos animales (ej: tunicados) y algunas pocas bacterias ((Lynd *et al.*, 2002). La celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto por unidades de β -D-glucopiranosas, unidas por enlaces glicosídicos β -(1-4). La celobiosa es la unidad repetitiva más pequeña de la celulosa y puede ser convertida a residuos de glucosa. En la Figura 1, se muestra la estructura molecular de la cadena de celulosa y como las moléculas de

celulosa se unen entre sí mediante enlaces de puente de hidrógeno usando el OH libre (Kumar *et al.*, 2008).

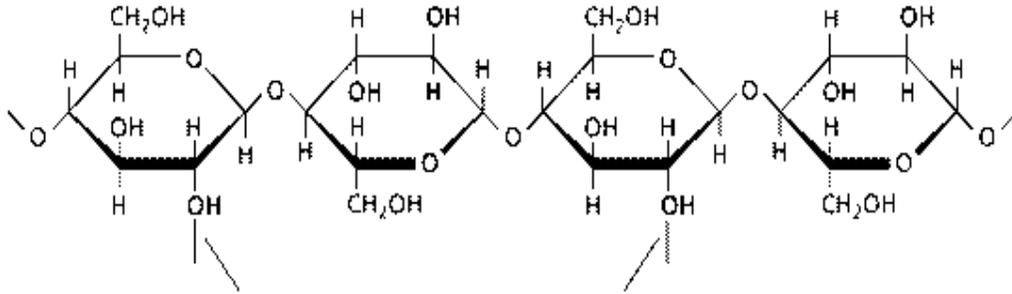


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa

A partir de estudios bioquímicos de los sistemas de celulasas de hongos y bacterias, aeróbicos y anaeróbicos, las enzimas se han clasificado en tres grupos basados en sus propiedades estructurales: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Ver Figura 2).

Las endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas cortan la cadena de celulosa al azar en sitios amorfos internos, generando oligosacáridos de varios tamaños y consiguientemente cadenas con nuevas terminaciones. Las exoglucanasas incluyen 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas y 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas, actúan de manera progresiva en las terminaciones de la cadena de celulosa, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Y las β -glucosidasas: hidrolizan celodextrinas y celobiosa solubles en glucosa (Lynd *et al.*, 2002; Warren, 1996).

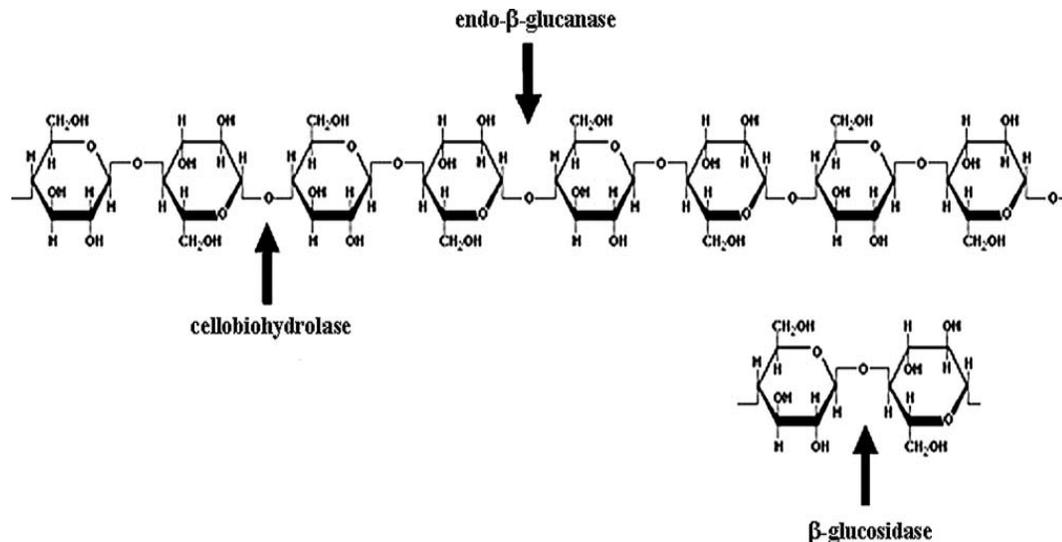


Figura 2. Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y β-glucosidasa.

Debido a la estructura de la celulosa, su degradación representa un desafío para los sistemas de celulasas, razón por la cual estos sistemas poseen una estructura modular, que incluye un módulo de unión a carbohidrato y un módulo catalítico, que le permite unirse a la superficie de la celulosa, se presume facilita la hidrólisis de la celulosa al acercar el dominio catalítico a la celulosa insoluble (Lynd *et al.*, 2002).

Hemicelulosa y bioconversión. La hemicelulosa es un polímero heterogéneo, construido por pentosas (D-xilosa, D-arabinosa), hexosas (D-manosa, D-glucosa, D-galactosa) y ácidos urónicos. Los componentes de la hemicelulosa varían según sea madera dura o suave, la primera está compuesta mayoritariamente por xilanos, y la segunda por glucomanos. La hemicelulosa puede ser extraída con soluciones alcalinas (Kumar *et al.*, 2008).

En la degradación de la hemicelulosa interfieren varias enzimas dependiendo de la naturaleza de la molécula, las compuestas por xylan son degradadas por endo-1,4-β-xilanasas, β-xilosidasas, α-glucoronidasas, α-L-arabinofuranosidasas y esterasas acetilxilan. En la descomposición de glucomanos median las enzimas β-endomananasas que hidrolizan la estructura central resultando en manobiosas y manotriosas. Y las β-manosidasas que liberan manosa de los extremos no

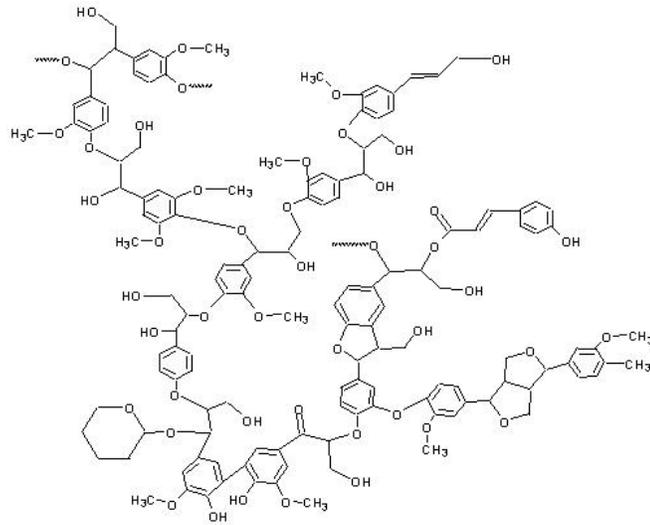


Figura 4. Estructura molecular de la lignina.

La principal diferencia funcional de las LiPs y las peroxidasa clásicas, es que las LiPs pueden oxidar anillos aromáticos que están moderadamente activados por sustituyentes donantes de electrones, mientras que las peroxidasa clásicas sólo actúan en substratos aromáticos fuertemente activados. La mayoría de los cortes ocurren entre el C_α y el C_β de la cadena lateral del propilo liberando benzaldehídos (Ver Figura 5).

Las LiPs son oxidantes fuertes que interactúan directamente con estructuras de lignina no fenólicas degradándolas, pero lo hacen ineficientemente, y aparentemente no pueden penetrar los pequeños poros de la lignocelulosa. Se han descrito tres tipos de peroxidasa; lignino peroxidasa (LiPs), manganeso peroxidasa (MnPs) y las peroxidasa versátiles (VP); las propiedades únicas de estas peroxidasa indican que contribuyen a la lisis de la lignina, sin embargo aún no se conoce con claridad el papel que cada una desempeña, ya que por sí mismas no son capaces de degradar lignocelulosa *in vitro*. Por lo cual es necesario realizar más estudios para poder comprobar, cual peroxidasa puede estar ausente sin comprometer la capacidad de degradar lignocelulosa de los microorganismos (Hammel y Cullen, 2008).

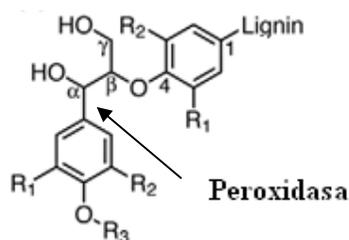


Figura 5. Estructura molecular de la lignina y sitio de acción de la lignino peroxidasa.

Microorganismos con actividad lignocelulítica. Existe una alta diversidad taxonómica entre los microorganismos con actividad lignocelulítica, dicha característica se cree como resultado de una evolución convergente debido a la alta divergencia genética y a la presión existente por la gran disponibilidad de biomasa vegetal. En el dominio *Eucarya* la habilidad de degradar celulosa se encuentra ampliamente distribuida, desde los microorganismos más primitivos como los Chytridomycetes a los derivados como los Basidiomycetes. En las eubacterias los órdenes con mayor cantidad de degradadores de celulosa son los *Actinomycetales* que son predominantemente aeróbicos, y los *Clostridiales* de tipo anaeróbico (Lynd *et al.*, 2002).

Algunos ejemplos de microorganismos con sistemas de celulosas, xilanasas y peroxidasa bien identificados son los siguientes cepas mesofílicas con capacidad de degradar celulosa *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*; el género *Aspergillus* tiene características que hacen que sea ideal para aplicaciones industriales tales como alta capacidad de fermentación y alto nivel de secreción de proteínas (DeVries y Visser, 2001)

Algunos hongos termofílicos son: *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum* *Clostridium straminisolvens* y *Thermonospora curvata*. De las bacterias reportadas se encuentran: *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas Wmi*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothamus cellulolyticus*, y *Saccharophagus degradans* (Kumar *et al.*, 2008). Otros microorganismos detectados son *Cellulomonas fimi* posee xilanasas, *Trichoderma reesei* con endoglucanasas, *Escherichia coli* tiene β -galactosidasas y *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* con sistemas de celulasas (Warren, 1996).

Estudios sobre la microbiota intestinal de coleópteros. El proceso de degradación de madera por los habitantes del intestino de insectos no está totalmente claro, sin embargo se sabe que estos insectos han desarrollado condiciones óptimas en sus intestinos para la degradación de la misma, tales como regiones aeróbicas donde albergan microorganismos especializados que degradan los polisacáridos complejos y la lignina. Se tiene especial interés en los coleópteros debido a que en ellos, el proceso de degradación de la lignocelulosa se da en un período de tiempo corto (solo unas horas), lo cual es sorprendente comparado con las semanas que pueden durar los sistemas de hongos en conseguir una degradación similar (Geib *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2003).

Existe gran cantidad de asociaciones simbióticas entre microorganismos e insectos, los cuales proveen a los invertebrados de varias funciones metabólicas, incluyendo síntesis de aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroides y feromonas, degradación de sustratos nutricionales, y detoxificación de compuestos inhibitorios, funciones que habilitan a los insectos a utilizar recursos nutricionales antes inaccesibles y ocupar hábitats adicionales. Estos microorganismos pueden ser endosimbiontes obligados o pueden ser producto de interacciones casuales debido a que comparten el mismo hábitat (Sung *et al.*, 2003).

Poco se conoce sobre la diversidad concreta de bacterias y hongos asociadas a este microecosistema y si su composición varía dependiendo del insecto o del lugar donde este se esté alimentando. En un estudio realizado en dos especies de insectos xilófagos un escarabajo del orden Cerambycidae *A.glabripennis* y la termita *Z. angusticollis*, se demostró la capacidad que poseen de degradar la lignina. Sin embargo, los hongos estudiados fueron aislados de la sección posterior del intestino o proctodeo, la sección estudiada a pesar de tener una gran riqueza, es de ambiente anaerobio por lo que se excluyeron del estudio posibles microbios aerobios con capacidad de degradar lignina (Geib *et al.*, 2008).

Según Sung *et al.* (2003) hay levaduras que se encuentran estrechamente relacionadas con escarabajos del orden Passalidae, hasta un nivel de comensalismo o simbiosis, pues en una serie de pasálidos analizados provenientes de localidades distantes presentaron levaduras de alta similitud

genética en sus intestinos. Además, estas levaduras tenían la habilidad de fermentar y asimilar la xilosa, razón por la cual una asociación simbiótica facilitaría la invasión de los escarabajos en sustratos maderables.

Estimadores de biodiversidad. Determinar la diversidad total de microorganismos en una comunidad mediante muestreo constituye un reto; principalmente por la gran diversidad y porque al aumentar el tamaño de la muestra se continúan aislando nuevos microorganismos, obteniéndose así curvas de muestreo lineales, lo que da la idea que la diversidad microbiana es incontable. Por esta razón, es necesario un método que permita extrapolar con confianza los resultados de un muestreo a la población verdadera de una comunidad.

Los estimadores de diversidad más usados son los paramétricos y los no paramétricos. Los paramétricos estiman el número de especies no observadas en una comunidad ajustando los datos de un muestreo a modelos de abundancia relativa de especies, de esta manera se puede medir el número total de especies en la comunidad; el principal impedimento de este método es que aún no se conoce un modelo que represente con certeza la abundancia relativa de especies en una comunidad. Los estimadores no paramétricos son los más adecuados para comunidades microbianas, los cuales consideran la proporción de especies que han sido observadas repetidas veces y aquellas que solo han sido observadas una vez. En una comunidad muy diversa la probabilidad que una especie sea observada más de una vez será baja, y la mayoría de las especies solo estarán representadas por un individuo en una muestra. Lo opuesto sucede en una comunidad poco diversa, donde la probabilidad de observar una especie será más alta, y muchas especies serán observadas muchas veces en una muestra (Hughes *et al.*, 2001).

Actualmente la facilidad de obtener una vasta cantidad de secuencias de marcadores moleculares como el 16S en bacterias ha permitido estudiar la diversidad de las comunidades microbianas. La diversidad biológica se estima dentro de una comunidad (diversidad- α) mediante, la riqueza que es el número total de especies o, estimando la abundancia relativa de especies. Los

estimadores cualitativos para determinar la diversidad en una comunidad están basados en las especies y los más comunes son Chao 1 y ACE. Los cualitativos que se valen de la abundancia de especies y son el índice de Simpson y el de Shannon los más utilizados (Lozupone y Knight, 2008).

También se mide la diversidad entre comunidades o a lo largo de un gradiente ambiental (diversidad- β), que normalmente se caracteriza usando el número de especies compartidas entre las dos comunidades. Los estimadores cualitativos para determinar la diversidad entre comunidades son el índice de Jaccard y Sørensen que están basados en especies, y los basados en divergencia genética esta el Unweighted UNIFRAC y Similitud Taxonómica. Los métodos cuantitativos basados en especies son el Índice Cuantitativo de Sørensen, y la medición Morisita-Horn, basados en divergencia esta el Weighted UNIFRAC, F_{ST} y el DPCoA. Los métodos basados en divergencia toman en cuenta la distancia entre pares de taxones y son más poderosos debido a que similitudes en el gen16S ARNr frecuentemente se correlaciona con similitudes fenotípicas claves tales como capacidades metabólicas (Lozupone y Knight, 2008).

OBJETIVO GENERAL

- Describir la diversidad de bacterias y hongos asociados al intestino de larvas de insectos del orden coleóptera y determinar sus propiedades lignocelulíticas mediante ensayos enzimáticos para evaluar su uso potencial en la bioconversión de biomasa en biocombustibles

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la taxonomía molecular de los microorganismos aislados mediante la amplificación de marcadores moleculares.
- Evaluar en los microorganismos aislados la presencia o ausencia de actividad para enzimas lignocelulíticas mediante cultivo en medios selectivos.
- Determinar la diversidad de hongos y bacterias del intestino de larvas de coleópteros mediante estimadores de diversidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de las muestras. La recolección de las muestras que se utilizaron en este estudio fue hecha por la sección de Gestión de Muestras de la Unidad de Bioprospección del INBio. Las colectas se enmarcan dentro del permiso de Acceso a los Elementos o Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad con permisos R-CM-INBio-40-2008-OT y R-CM-INBio-48-2008-OT, otorgados por la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) a la Asociación Instituto Nacional de Biodiversidad.

Se recolectaron insectos presentes dentro de troncos en descomposición, en los siguientes Parques Nacionales de nuestro país: Barbilla, Rincón de la Vieja, Carara, Piedras Blancas, Volcán Arenal, Tortuguero, y Volcán Tenorio; además de la Reserva Biológica Hitoy Cerere. Abarcando zonas de vida desde bosque tropical húmedo en el caso de Barbilla hasta bosque montano como el Volcán Arenal, y algunos como el Volcán Tenorio que abarcan diferentes zonas de vida y formaciones vegetales; la ubicación de los sitios de recolecta se ilustra en la figura 6.

Se obtuvieron 38 larvas de insectos del género coleóptera distribuidas en 5 familias a saber: Elateridae, Scarabaeidae, Cerambicidae, Passalidae y Tenebrionidae. Presentando mayor abundancia las familias Scarabaeidae y Passalidae con 14 y 15 accesiones respectivamente (ver Anexo 1).

Aislamiento de bacterias y hongos. Las larvas fueron disectadas en condiciones asépticas y se cultivó la sección del proctodeo del intestino en medio Luria-Bertani (10 g/L triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, pH 7.0) para bacterias y en Papa-dextrosa Agar (Almidón de papa 4 g/l, dextrosa 20 g/l y agar 15 g/l) para hongos y se incubaron a 28 °C durante 48h, las cepas se diferenciaron por características morfológicas. El trabajo de colecta y aislamiento fue realizado previamente por los funcionarios del INBio



Figura 6. Distribución geográfica de las larvas muestreadas en Costa Rica, con el objetivo de estudiar la microbiota intestinal de las mismas.

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. La extracción del ADN de las cepas bacterianas se realizó siguiendo las instrucciones del método NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), el protocolo se detalla en el Anexo 1. El ADN de hongos se extrajo con DNeasy Plant MiniKit (Qiagen®, Valencia, California, E.E.U.U.), protocolo descrito en el Anexo 2; para mejorar la calidad del ADN, se agregó al protocolo un paso adicional de precipitación de proteínas con acetato de potasio (3M, pH 5.2), y se redujeron las impurezas con cloroformo. Ambos kits permitieron obtener ADN altamente purificado que pudo ser usado directamente en PCR. La calidad del ADN obtenido se determinó cualitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con un voltaje de 100V por 30 min.

El marcador molecular 16S ARNr se amplificó del ADN extraído de bacterias, usando los iniciadores 27f y 1492r (Lane, 1991). Para la identificación de hongos se utilizó la región ITS1-5.8S – ITS2, la cual se amplificó por PCR del total de

extractos de ADN usando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y el iniciador reverso ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen total de 50 µl con los siguientes componentes de reacción: 10 µl de 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2.5 µl de MgCl₂ 25mM (Promega), 1.5 µl de iniciadores (20 ng/µl), 1 µl de PCR Grade Nucleotide Mix® 10 mM (Roche), 3 µl de ADN (10-100 ng), 0.4 µl GoTaq®Flexi 5u/µl (Promega) y 30,1 µl de agua libre de nucleasa (Fermentas). Las amplificaciones se realizaron en el termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), para bacterias se siguieron las siguientes condiciones: una etapa inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 51 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y 30 seg, y 5 min de extensión a 72 °C. En la amplificación del marcador ITS en hongos se utilizó el siguiente proceso: una etapa inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 45 seg y 72 °C por 45 seg y 30 seg, y 5 min de extensión a 72 °C. La efectividad del proceso de amplificación se observó como la presencia de una sola banda en geles de agarosa al 2%, con la escalera de peso molecular 1 Kb Mass Ruler (Fermentas). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se envió cada región amplificada con su par de imprimadores respectivos a las instalaciones del Instituto contra el cáncer Dana Farber en la Universidad de Harvard, Boston Massachusetts, donde se efectuó la secuenciación.

Distribución de filotipos aislados. Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando el programa SeqMan (DNASTAR, Madison, WI). Con el fin de determinar la identidad de las bacterias y hongos, las secuencias se compararon con la base de datos Genbank usando la herramienta BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information), y con la base de datos Ribosomal Database Project II usando la herramienta Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu>). Los emparejamientos más cercanos fueron usados para identificar el grupo a donde cada secuencia pertenece.

Las secuencias de la región 16S e ITS para bacterias y hongos respectivamente, fueron alineadas con el programa ClustalW (Higgins, Bleasby y Fuchs, 1992) y

luego optimizadas con el programa BIOEDIT (Hall, 1999). El alineamiento fue procesado con el programa DNADIST de PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu>) para generar una matriz de distancia. Esta matriz mediante el programa DOTUR (Schloss y Handelsman, 2005), permitió agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) según el algoritmo el Vecino más Cercano. En este estudio se basó en un estándar del 97% de similitud de secuencias para distinguir entre bacterias de distinta especie y para distinguir entre hongos un estándar del 90% de similitud para asignar las secuencias a un mismo OTU.

Actividad Lignocelulítica. Las bacterias aisladas fueron probadas por su actividad lignocelulítica con medios de cultivo selectivos con única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) y/o lignina (Sigma), los componentes de estos medios se adjuntan en el Anexo 3 y 4. La hidrólisis de estos compuestos se reveló a 48 horas por 28 °C de cultivadas las bacterias utilizando Rojo Congo, un tinte que se une al CMC. Después de este paso, se distinguieron halos claros donde la bacteria degradó la CMC, y el resto del medio en la placa permaneció rojo. En el caso de los medios con lignina, se observó un oscurecimiento en donde hubo oxidación de la misma por los microorganismos ensayados. Los ensayos fueron realizados un mínimo de dos veces por cada aislamiento.

Estimadores de biodiversidad. Se determinó la riqueza observada y la riqueza esperada de la comunidad de bacterias y hongos con el programa DOTUR, para calcular la primera se calculó el estimador Collect y, la riqueza esperada se calculó con el Chao1; este estimador no paramétrico calcula la diversidad de una comunidad basado en el número de singletons (OTU's representados por sólo una secuencia) y dobletones (OTU's representados por dos secuencias) encontrados en una muestra. Los resultados del estimador Chao1 son reportados para un 3% de diferencia entre secuencias de bacterias, y un 10% entre hongos. Con el mismo programa se calcularon los índices de Diversidad Simpson y Shannon-Weaver basados en las especies y el número de veces que cada una

fue observada, lo cual nos da una medida de la diversidad dentro de la comunidad. El índice de diversidad Shannon mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción con que existen en la población, resultando en la diversidad de la muestra (Somarriba, 1999). El índice de Simpson representa la probabilidad de que dos individuos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. Ambos índices fueron estimados para la comunidad de bacterias y la de hongos aisladas del intestino de larvas.

Las comunidades entre los diferentes sitios muestreados y entre las familias de coleóptera colectadas se compararon mediante el programa UNIFRAC ponderado (<http://bmf.colorado.edu/unifrac>), que se vale de los cambios en la abundancia relativa de los linajes, y en la información filogenética entre diferentes comunidades y nos da la probabilidad de que dos sitios comparados sean significativamente diferentes.

RESULTADOS

Extracción de ADN y PCR. Se logró la extracción de ADN de buena calidad de las 109 muestras de bacterias y 74 de hongos aisladas del intestino de larvas (Figura 7), observándose una mínima contaminación por ARN y proteínas, moléculas que pueden dificultar el proceso de amplificación. Para reducir la contaminación en las muestras de hongos que dieron problemas en la extracción del ADN y posteriormente en la amplificación mediante PCR, fue de gran ayuda el paso de precipitación adicional con acetato de potasio y el de purificación con cloroformo.

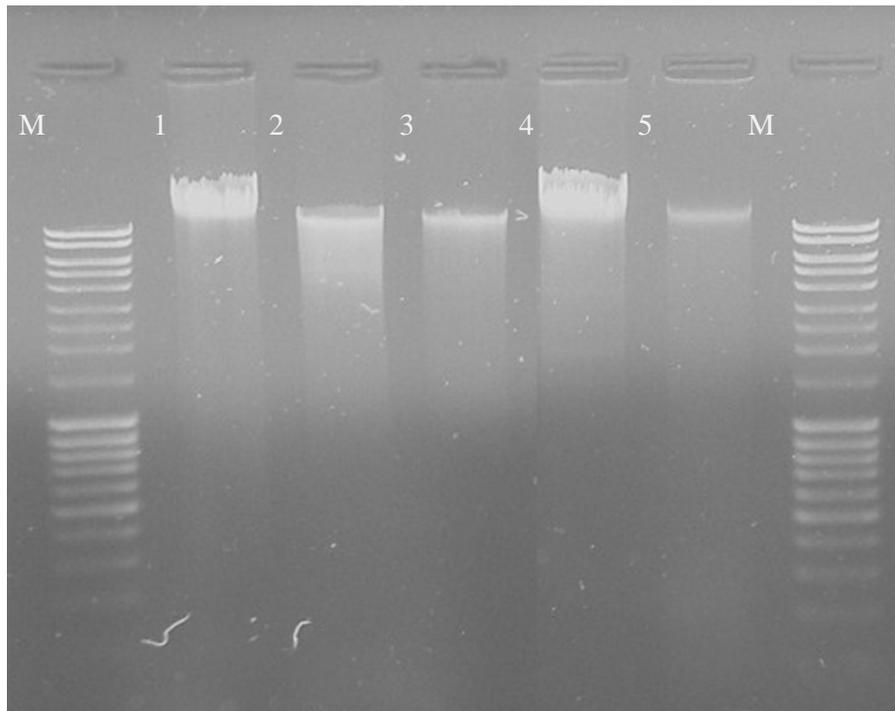


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de bacterias.

La amplificación de la región 16S se llevó a cabo eficientemente con el ADN extraído de las bacterias, en la figura 8 se muestra una banda definida en el gel de agarosa que representa la región amplificada de aproximadamente 1600 pb

correspondientes al extremo 5' del gen. La concentración de los fragmentos amplificados fue suficiente para el proceso de secuenciación.

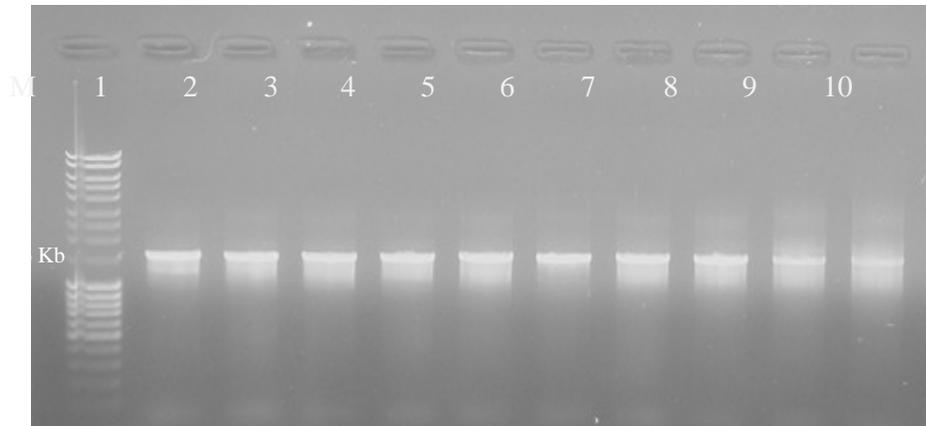


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del marcador molecular 16S en bacterias. Marcador molecular de 1 Kb

En la amplificación del marcador ITS en hongos se obtuvieron buenos resultados como se muestra en la Figura 9, los fragmentos amplificados mostraron buena calidad y tamaño alrededor de 500 pb, lo que es esperado debido a que es un marcador universal de tamaño variable en las especies de hongos.

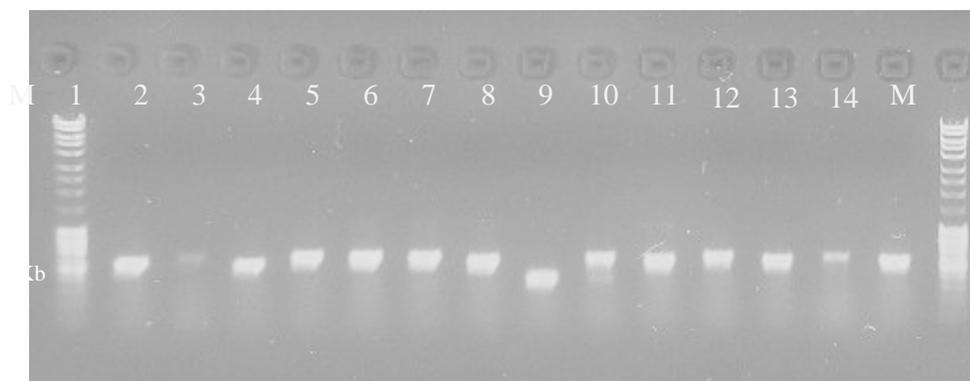


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del marcador molecular ITS en hongos. Marcador molecular de 1 Kb.

Distribución de filotipos aislados. Una vez identificados los microorganismos aislados, se eliminaron aquellos que correspondían a un mismo individuo y, se analizaron las muestras y los hongos y bacterias según el sitio de origen y la familia de coleóptera de procedencia.

En la figura 10 se observa que las larvas recolectadas en P.N Volcán Tenorio, P.N. Piedras Blancas y P.N. Barbilla presentaron mayor cantidad de bacterias en promedio por larva procesada, con valores de 5.3, 4.3 y 3.4 respectivamente; y las larvas de P.N. Rincón de la Vieja menor cantidad de todos los sitios con un valor de 2.3.

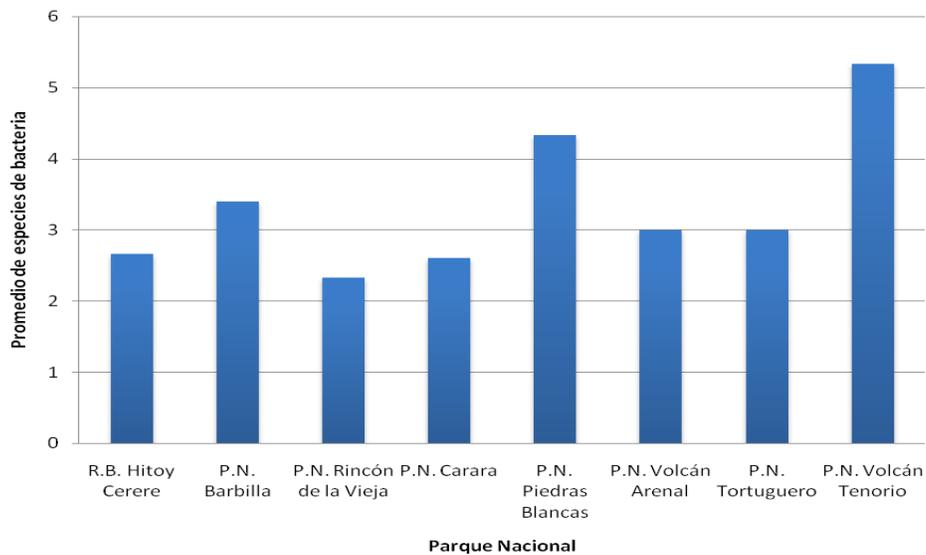


Figura 10. Promedio de especies de bacteria aisladas por larva por Parque Nacional. EXCELL.

Como se muestra en la Figura 11, las familias de coleóptera en las cuales se logró aislar una mayor cantidad de bacterias correspondieron a Elateridae y a Tenebrionidae con valores de 3,7 y 3 bacterias por larva en promedio. En las demás familias se obtuvo alrededor de 2 bacterias en promedio por larva. En general, el promedio de bacterias aisladas por intestino de larva es aproximadamente de 3.

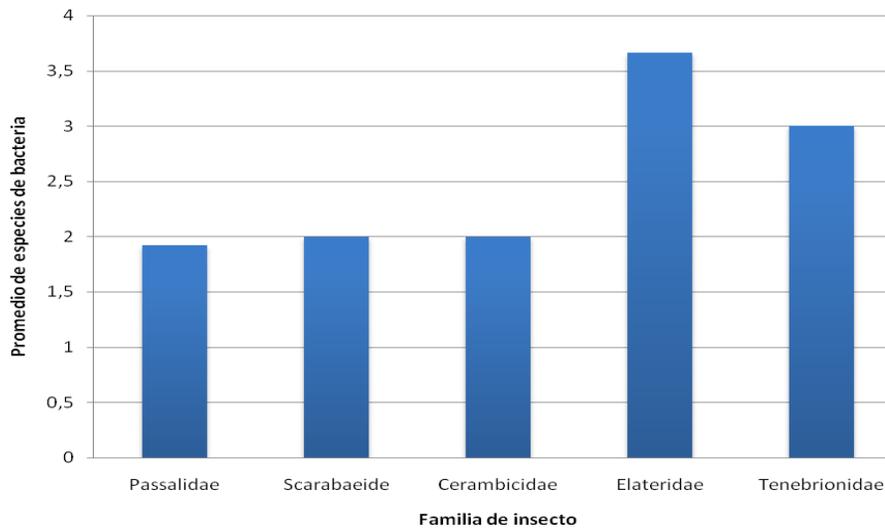


Figura 11. Promedio de especies de bacteria aisladas por larva por familia de coleóptera. EXCELL.

En el caso de hongos se aisló una mayor cantidad de hongos del P.N. Rincón de la Vieja (5.3), y de los demás sitios la cantidad aislada se aproxima a 2 hongos por larva.

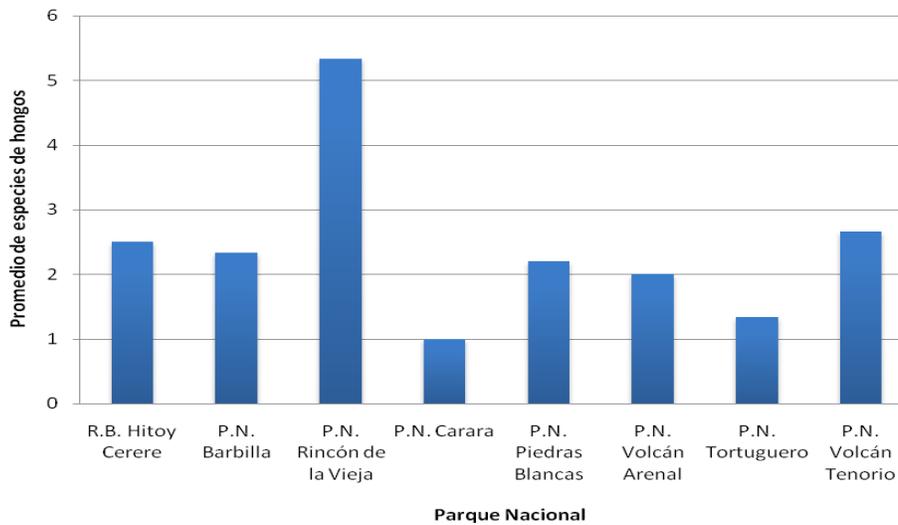


Figura 12. Promedio de especies de hongo aislados por larva por Parque Nacional. EXCELL

De igual manera que en bacterias, la suma de hongos aislados fue superior en las familias Elateridae y Tenebrionidae con valores de 3.5 y 3 hongos por larva respectivamente.

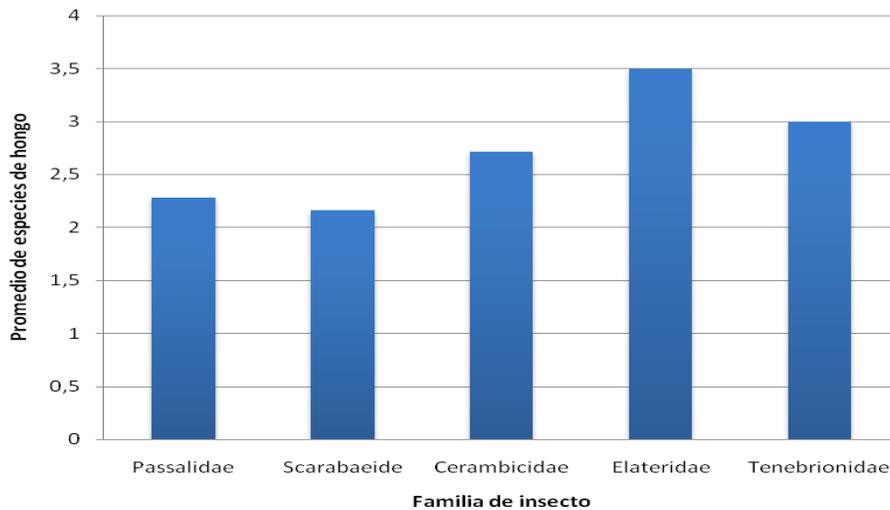


Figura 13. Promedio de especies de hongo aislados por larva por familia de coleóptera. EXCELL.

En general, el promedio de bacterias y de hongos aislados por intestino de larva es cerca de 3 individuos.

Los métodos practicados para el aislamiento de bacterias y hongos a partir de los intestinos de escarabajos permitieron obtener una gran cantidad de microorganismos, y mediante la secuenciación del marcador 16S en bacterias y la región ITS en hongos, de las 205 bacterias y 85 hongos separados mediante técnicas tradicionales se redujo la cantidad a 109 especies de bacteria y 74 de hongos. Además dichas poblaciones presentaron una alta diversidad filogenética. Se encontraron hongos pertenecientes a 18 distintos órdenes de los cuales un 54 % (para un total de 74 hongos) pertenecen al orden Hypocreales, que a su vez fue el único orden presente en las cinco familias de coleóptera muestreadas. Seguidamente en cantidad de representantes los órdenes Eurotiales y Microascales con un 9% y 5% respectivamente. Los restantes ordenes se encontraron en baja cantidad y distribuidos pobremente entre las familias, como se observa en el cuadro 1.

Cuadro 1. Distribución de filotipos de hongos aislados de las familias de coleóptera.

Orden	Passalidae	Scarabaeidae	Elateridae	Tenebrionidae	Cerambycidae	Total
Agaricales			1	1		2
Boletales		1				1
Botryosphaeriales					1	1
Capnodiales		1				1
Corticiaceae				1		1
Chaetothyriales		1			1	2
Diaporthales				1		1
Dipodascaceae		1				1
Dothideomycetes			1			1
Eurotiales	2	1			4	7
Eurotiomycetes	1					1
Hypocreales	18	12	2	1	7	40
Microascales		2	1	1		4
Mucorales	2	1				3
Ophiostomatales		2	1			3
Polyporaceae				1		1
Tremellales	1				1	2
Xylariales	1		1			2

De las bacterias aisladas se obtuvieron 12 órdenes, de los cuales la distribución entre órdenes y familias de insectos fue más homogénea que en el caso de los hongos. Las clases de bacteria dominantes fueron la clase Gammaproteobacteria y Firmicutes correspondientes a un 43 % y un 36% respectivamente de las 109 bacterias aisladas, además dicha clases son las únicas presentes en todas las familias de coleóptera analizadas. También sobresale la clase de las Actinobacterias con un 14% como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Distribución de filotipos de bacterias aisladas de las familias de coleóptera

Clase	Passalidae	Scarabaeidae	Elateridae	Tenebrionidae	Cerambycidae	Total
Actinobacteria	8	6	1	-	-	15
Alphaproteobacteria	3	-	-	-	-	3
Betaproteobacteria	1	2	-	-	-	3
Firmicutes	14	17	4	2	2	39
Flavobacteria	-	-	1	-	-	1
Fusobacteria	1	-	-	-	-	1
Gamaproteobacteria	10	17	5	7	8	47

Actividad Lignocelulítica. Las especies de hongos con capacidad de degradar lignina y carboximetilcelulosa *in vitro* se muestran en el cuadro 4, un 47% de los hongos aislados pudo digerir CMC y un 35 % lignina. Se puede destacar que la actividad enzimática para digerir CMC en los hongos, en general se mostró débil comparada con la demostrada en la digestión de lignina por las cepas identificadas como *Coprinellus sp*, *Nectria mariannaeae*, *Phlebia sp* y *Pycnoporus sanguineus*, que poseen alta capacidad de digerir la lignina extendiéndose más de su halo de crecimiento (ver Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies de hongos con capacidad de degradar lignina y Carboximetilcelulosa (CMC)

Especie de hongo	Valoración *	
	CMC	Lignina
<i>Arthrographis cuboidea</i>	1	
<i>Aspergillus sp</i>	1	1
<i>Bionectria ochroleuca</i>	1	
<i>Bionectria rossmaniae</i>	1	
<i>Cladophialophora devriesii</i>		1
<i>Coprinellus sp</i>	1	2
<i>Cosmospora coccinea</i>		1
<i>Desconocida1</i>	1	1
<i>Fusidium griseum</i>	1	
<i>Geotrichum sp</i>	1	
<i>Graphium basitruncatum</i>	1	1

Cuadro 3. Especies de hongos con capacidad de degradar lignina y Carboximetilcelulosa (CMC)

Especie de hongo	Valoración *	
	CMC	Lignina
<i>Harposporium jannus</i>		1
<i>Hypocrea jecorina</i>	1	
<i>Hypocrea lixii</i>	1	1
<i>Hypocrea virens</i>	1	1
<i>Lanatonectria flocculenta</i>	1	
<i>Lasioidiploidia parva</i>	1	1
<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	1	1
<i>Metarhizium anisopliae</i>		1
<i>Mucor racemosus</i>	1	1
<i>Nectria lungdunensis</i>		1
<i>Nectria mariannaeae</i>	1	2
<i>Nectria pseudotrichia</i>	1	
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	1
<i>Paecilomyces marquandii</i>	1	
<i>Pencillium olsonii</i>	1	
<i>Penicillium citrinum</i>	1	1
<i>Penicillium meleagrinum</i>	1	
<i>Peroneutypa scoparia</i>	1	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1	1
<i>Phlebia sp</i>	1	2
<i>Phomopsis columnaris</i>	1	1
<i>Pseudallescheria boydii</i>	1	1
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	1	2
<i>Sporothrix lignivora</i>		1
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	
<i>Trichoderma hamatum</i>	1	1
<i>Trichoderma sp</i>	1	1
<i>Trichoderma spirale</i>	1	
<i>Trichosporon akiyoshidainum</i>	1	
<i>Trichosporon laibachii</i>	1	1

* 1. Halo de degradación del tamaño de la colonia.

2. Capacidad de degradar a mayor distancia que alrededor de la colonia.

La colección de bacterias fue ensayada *in vitro* en medios de crecimiento con carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono, de las bacterias ensayadas un 20% pudo utilizar CMC y lograr crecer en este medio. De las cuales se destacan *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp*, *Microbacterium oxidans*, *Achromobacter sp* y *Paenibacillaceae sp* por tener un crecimiento más acelerado, lo cual demuestra alta capacidad de degradar este compuesto. Las demás bacterias con capacidad de degradar CMC, pero en menor cantidad relativa al tamaño de la colonia formada se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Especies de bacterias con capacidad de degradar carboximetilcelulosa

Especie de bacteria	Valoración *
<i>Achromobacter sp</i>	1
<i>Achromobacter sp</i>	2
<i>Acinetobacter sp</i>	1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus macroides</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Bacillus sp</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	2
<i>Citrobacter farmeri</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Enterobacter sp</i>	1
<i>Enterococcus sp</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	1
<i>Microbacterium oxidans</i>	2
<i>Novosphingobium sp</i>	1
<i>Paenibacillus sp</i>	2
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	1
<i>Serratia marcenscens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
<i>Streptomyces sp</i>	2
<i>Tsukamurella pulmonis</i>	1

* 1. Halo de degradación del tamaño de la colonia.

2. Capacidad de degradar a mayor distancia que alrededor de la colonia.

Las siguientes figuras muestran la forma en que se visualizaron los platos que se utilizaron en las pruebas enzimáticas, una vez que éstos fueron revelados. En la figura 14 se muestra una placa con medio CMC y 96 colonias bacterianas de distintas cepas, los halos decolorados alrededor de las colonias indican la degradación del CMC.

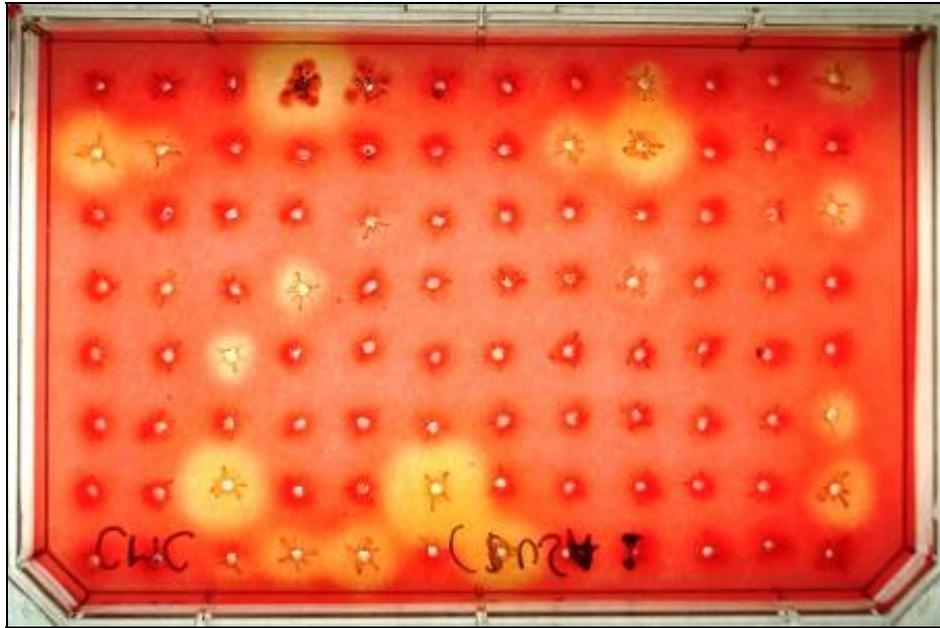


Figura 14. Fotografía de bacterias cultivadas en medio selectivo CMC, los halos alrededor de las colonias indican el CMC digerido por las bacterias, revelado con Rojo Congo.

En la figura 15 se observa una placa de 96 pocillos, cada uno corresponde a una cepa distinta de hongo, de igual manera la degradación de CMC se nota como una decoloración del color.

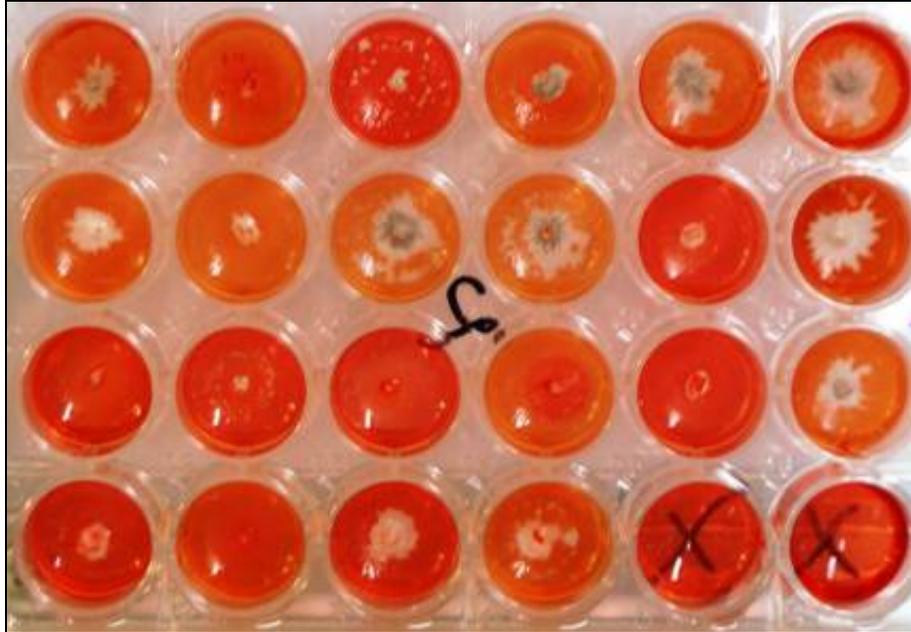


Figura 15. Fotografía de hongos cultivados en medio CMC, los halos alrededor de las colonias indican el CMC digerido por los hongos, revelado con Rojo Congo.

En la siguiente figura se muestra el oscurecimiento del medio lignina indicando la oxidación de la misma por los hongos presentes en cada pocillo.

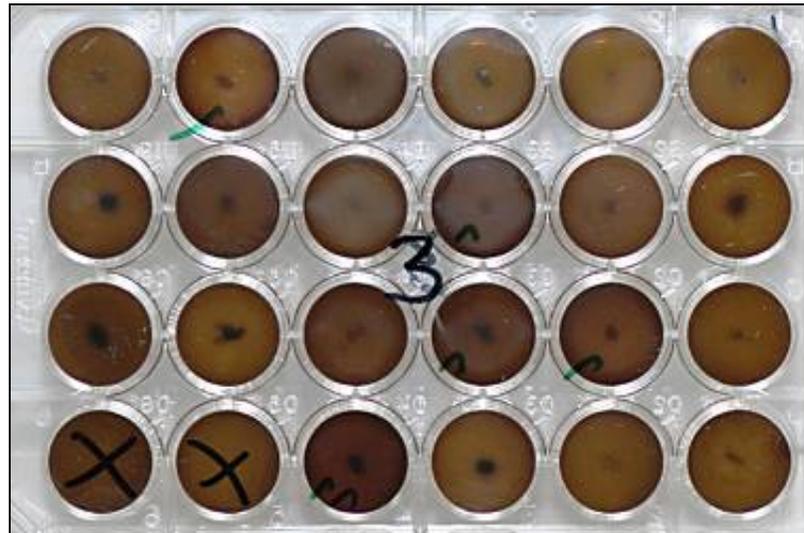


Figura 16. Fotografía de hongos cultivados en medio lignina, el medio oscurecido indica la oxidación de la lignina.

Estimadores de diversidad. Los resultados de los estimadores de diversidad y riqueza calculados para la población de bacterias y de hongos, se muestran en el cuadro 5. La riqueza observada en la población de bacterias y de hongos fue similar a pesar de la mayor cantidad de bacterias aisladas, con un valor de 46 especies para hongos y 49 bacterias, según el estimador Chao1 que indica la riqueza esperada, en esta comunidad en particular hay alrededor de 108 especies de hongos y 78 bacterias, lo que nos permite ver la eficiencia del método de aislamiento utilizado y la riqueza de especies de este micro ecosistema.

El índice de diversidad Shannon para ambas poblaciones tuvo un valor muy cercano de 3,47 para hongos y 3,57 para bacterias, debido a que este índice se basa en la riqueza observada y el número de especies observadas en ambas poblaciones fue similar. No obstante, en la población de bacterias el índice presentó un valor numérico mayor ya que los individuos se distribuyeron más homogéneamente entre todas las especies, lo que causa que el valor del índice aumente.

La población de bacterias según el índice Simpson posee mayor diversidad, ya que la probabilidad de tomar dos individuos al azar de la comunidad y que ambos sean de la misma especie es menor que en el caso de la población de hongos, que se encuentra conformada principalmente por el orden de los Hypocreales.

Cuadro 5. Estimadores ecológicos de hongos y bacterias

	Riqueza observada	Riqueza esperada	Diversidad Shannon	Diversidad Simpson
Hongo $D_{0,1}$	46	108 (IC 71-199)	3,47	0,045
Bacteria $D_{0,05}$	49	78 (IC 60-126)	3,57	0,032

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron los microorganismos presentes en el micro ecosistema del intestino de coleópteros, con un enfoque más integral al utilizado en otros estudios debido a que se investigaron ambos hongos y bacterias. El conocer las especies de microorganismos que habitan el intestino permitirá inferir con mayor certeza las interacciones que ocurren normalmente en el mismo con el propósito de degradar los compuestos lignocelulósicos, que debido a la complejidad estructural de la planta es un proceso sinérgico en donde colaboran una serie de microorganismos (Lynd *et al.*, 2002).

De las familias de coleóptera estudiadas se obtuvo una mayor cantidad de microorganismos de Elateridae y Tenebrionidae, por lo que se proponen como la mejor opción para futuros aislamientos de hongos y bacterias del intestino de larvas valiéndose de técnicas basadas en medios de cultivos. No obstante este método puede sesgar los resultados hacia aquellos individuos que sean fácilmente cultivables o algunos no sean detectados debido a que se encuentran en baja cantidad en una población mixta con alguna especie predominante (Zhang *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se podrían realizar estudios basados en técnicas independientes de medios de cultivo o técnicas para aislar microorganismos anaeróbicos como complemento del estudio actual. Sin embargo, tales microorganismos no cultivables o de hábito anaeróbico, representan mayor dificultad para futuras aplicaciones de actividad enzimática, y en la producción de biocombustibles.

La mayor parte de los hongos aislados son del tipo ascomicetes caracterizados por una forma de vida saprófita, razón por la cual se cree fueron ingeridos por estos escarabajos. De los hongos basidiomicetes identificados todos presentaron capacidad de degradar lignina y carboximetilcelulosa. En el caso del género *Trichosporon*, son levaduras anamórficas que en general se encuentran asociadas al suelo, algunas de estas cepas participan activamente en la mineralización de plantas en descomposición y no son considerados habitantes normales del intestino de los escarabajos. Las demás especies de basidiomicetes encontradas *Phlebia sp.*, *Coprinellus sp* y *Pycnoporus sanguineus* se reportan

como saprófitos habitantes comunes de troncos en descomposición, formadores de cuerpos fructíferos de gran tamaño (Middelhoven *et al.*, 2001).

Las clases de bacterias con mayor cantidad de individuos fueron Gammaproteobacterias, Firmicutes y Actinomycetales, que fueron encontradas en todas las familias de coleóptera, lo que podría indicar que estos insectos son hospederos comunes de estas bacterias. En el grupo de los Firmicutes muchos producen enzimas extracelulares, como hidrolasas, que rompen polisacáridos complejos hasta unidades asimilables por las células, lo cual se comprobó en este estudio con ocho cepas de bacilos con capacidad de degradar lignocelulosa. Según reporta Lynd *et al.* (2002) en el orden de los *Actinomycetales* hay gran cantidad de especies con capacidad de degradar madera. De los actinos aislados tres de ellos presentaron actividad enzimática que son: *Tsukamurella pulmonis*, *Streptomyces sp*, *Microbacterium oxidans*. En un estudio realizado en larvas de *Agrilus planipennis* (género coleóptera), se aislaron del intestino de larvas cepas de *Streptomyces sp*, con alta capacidad de degradar CMC *in vitro* (Vasanthakumar *et al.*, 2008).

Se encontraron una gran cantidad de hongos y bacterias con capacidad de degradar CMC y lignina *in vitro*, tales resultados promueven continuar con estudios de bioprospección en este micro ecosistema, además de futuros ensayos para utilizar dichos microorganismos en la realización de productos de valor a la sociedad, tal como biocombustibles a partir de biomasa vegetal de desechos agroforestales o, productos químicos orgánicos de interés (Kumar, 2008).

Los resultados de los índices de diversidad calculados, indican que hay una alta diversidad de hongos y bacterias, lo cual alienta futuras investigaciones para el descubrimiento de especies de microorganismos con capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se comprobó que el intestino de larvas de escarabajos del orden coleóptera constituye una buena fuente para la búsqueda de microorganismos debido a la alta riqueza de especies de hongos y bacterias, además de gran divergencia filogenética entre los microorganismos aislados.

Además se demostró la actividad lignocelulítica presente en gran parte de las bacterias y los hongos aislados del intestino de larvas en insectos del orden coleóptera. Sin embargo es recomendable realizar más ensayos a las cepas positivas con el fin de identificar todas las actividades enzimáticas relacionadas con sustratos lignocelulósicos y la efectividad de degradación de estos microorganismos en desechos agroindustriales.

Este estudio es de gran utilidad para obtener microorganismos y/o enzimas derivadas de estos que puedan ser utilizados para la reutilización de la biomasa vegetal y su conversión a productos útiles a la sociedad.

BIBLIOGRAFÍA

- DEVRIES, R.; VISSER, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(4): 497-522.
- GEIB, S.; FILLEY, T.; HATCHER, P.; HOOVER, K.; CARLSON, J.; JIMÉNEZ, M.; NAKAGAWA, K.; SLEIGHTER, R; TIEN, M. 2008. Lignin degradation in wood-feeding insects. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 105 (35): 12932-12937.
- HALL, T. 1999. Bio-edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- HAMMEL, K.; CULLEN, D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 349-355.
- HIGGINS, D; BLEASBY, A.; FUCHS, R.1992. CLUSTAL W: improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*. 8(2):189-191.
- HUGHES, J.; HELLMAN, J.; RICKETTS, T.; BOHANNAN, B. 2001. Minireview: counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4399-4406.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* 35: 377-391.
- LANE, D. 1991. 16S/23S rRNA secuencing. In Stachebrandt, E., Godfellow, M (ed). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, NY.
- LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. 2008. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS microbiol Rev*. 32: 557-578.
- LYND, L.; WEIMER, P.; VAN ZYL, W.; PRETORIUS, I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3): 506-577.

- MIDDELHOVEN, W.; SCORZETTI, G.; FELL, J. 2001. *Thichosporon porosum* comb. Nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/laibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Research*. 15-22.
- SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3):1501-1506.
- SOMARRIBA, E. 1999. Diversidad Shannon. *Revista Agroforestería en las Américas*. 6 (23).
- SUNG, S.; MARSHALL, C.; MCHUGH, J.; BLACKWELL, M. 2003. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeast. *Molecular Ecology*. 12. 3137-3145.
- VASANTHAKUMAR, A.; HANDELSMAN, J.; SCHLOSS, P.; BAUER, L.; RAFFA, K. 2008. Gut microbiota of an invasive subcortical beetle, *agrilus planipennis*. Fairmaire, across various life stages. *Molecular ecology and evolution*. *Environ. Entomol.* 37(5): 1344 – 1353.
- WARREN, R. 1996. Microbial Hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews of Microbiology*. 50: 183-212.
- ZHANG, N.; SUH, S.; BLACKWELL, M. 2003. Microorganisms in the gut of beetles: evidence from molecular cloning. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84. 226-233.

ANEXOS

Anexo 1. Información de las muestras recolectadas de insectos por cada sitio

Código	P.N.	Familia	Latitud			Longitud			Altitud
2552	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2553	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2554	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2555	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2556	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2557	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2559	Hitoy Cerere	Passalidae	9	40	18.3	-83	1	39.7	150
2574	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2575	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2576	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2577	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2579	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2580	Barbilla	Scarabaeidae	9	58	43.12	-83	28	23.11	460
2855	V. Rincón	Passalidae	10	46	29.4	85	20	41.3	782
2861	V. Rincón	Passalidae	10	46	53.8	85	20	53.9	905
2865	V. Rincón	Cerambycidae	10	46	53.8	85	20	53.9	905
2890	Carara	Cerambycidae	9	46	41,7	84	36	20,1	78
2891	Carara	Passalidae	9	46	41,7	84	36	20,1	78
2892	Carara	Passalidae	9	46	41,7	84	36	20,1	78
2893	Carara	Passalidae	9	46	41,7	84	36	20,1	78
2894	Carara	Scarabaeidae	9	46	41,7	84	36	20,1	78
2920	Piedras B.	Scarabaeidae	8	41	56,3	-83	12	29,2	198
2922	Piedras B.	Tenebrionidae	8	41	56,3	-83	12	29,2	198
2924	Piedras B.	Passalidae	8	41	56,3	-83	12	29,2	198
2926	Piedras B.	Scarabaeidae	8	41	56,3	-83	12	29,2	198
2956	V. Arenal	Scarabaeidae	10	26	49.9	84	43	41.5	589
2958	V. Arenal	Scarabaeidae	10	26	49.9	84	43	41.5	589
2959	V. Arenal	Cerambycidae	10	26	49.9	84	43	41.5	589
2961	V. Arenal	Scarabaeidae	10	26	49.9	84	43	41.5	589
3010	Tortuguero	Elateridae	10	32	14,3	-83	30	04.9.	0
3014	Tortuguero	Passalidae	10	32	4,8	-83	29	56,4	0
3016	Tortuguero	Cerambycidae	10	32	4,8	-83	29	56,4	0
3018	Tortuguero	Passalidae	10	32	3,2	-83	30	3,7	0
3020	Tortuguero	Elateridae	10	32	3,2	-83	30	3,7	0
3022	Tortuguero	Scarabaeidae	10	32	3,2	-83	30	3,7	0

3079	V. Tenorio	Tenebrionidae	10	42	25.5	84	59	22.8	727
3081	V. Tenorio	Elateridae	10	42	25.5	84	59	22.8	727
3083	V. Tenorio	Scarabaeidae	10	42	25.5	84	59	22.8	727

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN estándar utilizado en los aislamientos de hongos de intestinos de larvas de coleópteros (Dneasy Plant Mini® de Qiagen)

1. Tomar tejido vegetal y colocarlo en mortero con nitrógeno líquido. Macerar firmemente.
2. Transfiera material a eppendorf de 1.5 ml de manera que quede un volumen de aprox. 200 µL.
3. Agregue 400 uL de buffer AP1, 4 µL de RNAsa y 60µl de proteinasa K (10mg/ml). Mezcle vigorosamente en el vortex.
4. Incube la mezcla por 1 hora a 65°C. Cada 20 min. Invierta los tubos manualmente para mezclar su contenido.
5. Agregue 130 µL de buffer AP2 al lisado. Mezcle con el vortex e incube 10-15 minutos en hielo o a -20°C.
6. Centrifugue 5 min. A máxima velocidad. Tome el lisado (parte acuosa) y transfíralo a las columnas QIAshredder. Centrifugue 2 minutos a máxima velocidad.
7. Transfiera a nuevo eppendorf y agregue 1.5 volúmenes de buffer AP3/E al lisado. Mezcle vigorosamente.
8. Tome 650 uL de la mezcla y trasfíralo a las columnas Dneasy. Centrifugue 1 min a 10000 rpm. Descarte el fluido remanente. Repita este paso con el lisado sobrante del paso 7.
9. Coloque la columna en nuevo tubo y agregue 500 µL de buffer AW. Centrifugue por 1 minuto a 10000 rpm. Descarte el fluido remanente.
10. Agregue otros 500 µL de buffer AW y centrifugue 2 minutos a máxima velocidad para secar la membrana de la columna
11. Transfiera la columna a un nuevo eppendorf y agregue 100 µL de buffer AE o agua. Incube 5 minutos a temperatura ambiente. Opcionalmente repita este paso agregando el fluido de nuevo sobre la columna y centrifugue de nuevo.
12. Almacene a -20°C o -70°C, según necesidad de uso.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN estándar utilizado en los aislamientos de bacterias de intestinos de larvas de coleópteros (NucleoSpin®Tissue MACHEREY-NAGEL).

1. Crecer las bacterias en medio LB, incubar 48 h a 28 °C.
2. Agregar 50 mg de la bacteria en un tubo eppendorf.
3. Resuspender en 180 µl buffer T1, pipetear. Agregar 25 µl de proteinasa K. Vortex hasta desagregar las bacterias. Incubar a 56 °C por 1 h (agitar cada 20 min).
4. Agregar 20 µl de ARNasa e incube 5 min a temperatura ambiente.
5. Vortexear las muestras. Agregar 200 µl buffer B3. Agitar vigorosamente e incube a 70 °C por 10 min. Vortex.
6. Agregar 210 µl etanol (96-100%) a la muestra y agite vigorosamente.
7. Ensamblar la columna con el tubo de 2 ml para cada muestra. Cargar la muestra en la columna. Centrifugue por 1 min a 12000 rpm. Descartar el líquido filtrado y coloque la columna en el mismo tubo recolector. Repetir si la muestra no es arrastrada completamente por la matriz.
8. Agregar 500 µl de buffer BW. Centrifugar por 1 min a 12000 rpm. Descartar el líquido filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo recolector.
9. Agregar 600 µl de buffer B5. Centrifugar por 1 min a 12000 rpm. Descartar el líquido filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo recolector.
10. Centrifugar la columna por 2 min a 12000 rpm para secarla completamente.
11. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y agregar 100 µl de buffer BE precalentado a 70 °C. Incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar por 1 min a 12000 rpm.
12. Repetir el paso anterior tomando 90 µl del buffer BE filtrado.
13. Almacenar a 4 °C por periodos cortos o a -20 °C por periodos largos.

Anexo 4. Componentes del medio Carboximetilcelulosa, utilizado para comprobar actividad enzimática en los hongos y bacterias aislados del intestino de larvas.

Reactivo	Cantidad (g/l)
K ₂ HPO ₄	1,9
KH ₂ PO ₄	0,94
KCl	1,6
NaCl	1,43
NH ₄ Cl	0,15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,037
CaCl·H ₂ O	0,017
Extracto de levadura	0,1
Agar	15,0
Carboximetilcelulosa	7,5
pH	7,0

Anexo 5. Componentes del medio Lignina, utilizado para comprobar actividad enzimática en los hongos y bacterias aislados del intestino de larvas.

Reactivo	Cantidad (g/l)
NaNO ₃	2,0
MgSO ₄	0,5
KCl	0,01
Fe ₂ (SO ₄) ₃ H ₂ O	0,14
KH ₂ PO ₄	1,2
K ₂ HPO ₄	15,0
Agar	0,02
Extracto de levadura	1,01
Lignina	3

Anexo 6. Taxonomía de los hongos aislados de intestinos de larva de coleóptero

Aislamiento	Phylum	Orden	Genero	Especie
2252E	Basidiomycota	Tremellales	Trichosporon	laibachii
2555A	Ascomycota	Hypocreales	Paecilomyces	lilacinus
2555B	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	mariannaeae
2556C	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	lixii
2556D	Ascomycota	Hypocreales	Desconocida1	
2556E	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	mariannaeae
2556F	Ascomycota	Hypocreales	Metacordyceps	chlamydosporia
2559A	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	virens
2559B	Ascomycota	Mucorales	Rhizomucor	variabilis
2559C	Ascomycota	Mucorales	Mucor	hiemalis
2559D	Ascomycota	Hypocreales	Trichoderma	spirale
2574A	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	mariannaeae
2574B	Ascomycota	Ophiostomatales	Sporothrix	lignivora
2574C	Ascomycota	Capnodiales	Ramichloridium	anceps
2575A	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	lixii
2575B	Ascomycota	Dipodascaceae	Geotrichum	sp.
2575C	Ascomycota	Hypocreales	Fusarium	sp.
2575E	Ascomycota	Hypocreales	Cladophialophora	sp.
2576C	Ascomycota	Hypocreales	Paecilomyces	lilacinus
2577A	Ascomycota	Boletales	Desconocida2	
2577B	Ascomycota	Microascales	Pseudallescheria	boydii
2577C	Ascomycota	Eurotiales	Penicillium	citrinum
2579A	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	pseudotrichia
2579B	Ascomycota	Chaetothyriales	Cladophialophora	bantiana
2580B	Ascomycota	Ophiostomatales	Sporothrix	lignivora
2855D	Ascomycota	Hypocreales	Paecilomyces	lilacinus
2855K	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	lixii
2855L	Ascomycota	Hypocreales	Metarhizium	anisopliae
2855M	Ascomycota	Eurotiales	Penicillium	citrinum
2855N	Ascomycota	Hypocreales	Metacordyceps	chlamydosporia
2861F	Ascomycota	Eurotiales	Penicillium	meleagrinum
2865A	Ascomycota	Hypocreales	Trichoderma	sp.
2865E	Basidiomycota	Tremellales	Trichosporon	akiyoshidainum
2865G	Ascomycota	Eurotiales	Aspergillus	sp.
2865H	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	mariannaeae
2865I	Ascomycota	Eurotiales	Penicillium	waksmanii

2865K	Ascomycota	Eurotiales	Penicillium	olsonii
2865N	Ascomycota	Eurotiales	Paecilomyces	marquandii
2865O	Ascomycota	Chaetothyriales	Cladophialophora	devriesii
2890D	Ascomycota	Hypocreales	Bionectria	ochroleuca
2891E	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	virens
2920A	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	lixii
2922A	Basidiomycota	Polyporaceae	Pycnoporus	sanguineus
2922B	Basidiomycota	Corticaceae	Phlebia	sp.
2922I	Ascomycota	Microascales	Pseudallescheria	boydii
2924B	Ascomycota	Hypocreales	Fusarium	solani
2924F	Ascomycota	Xylariales	Peroneutypa	scoparia
2924G	Ascomycota	Hypocreales	Fusidium	griseum
2924I	Ascomycota	Hypocreales	Bionectria	rossmaniae
2924J	Ascomycota	Eurotiomycetes	Rhynchostoma	proteae
2926F	Ascomycota	Microascales	Pseudallescheria	boydii
2926G	Ascomycota	Hypocreales	Metarhizium	anisopliae
2928A	Ascomycota	Hypocreales	Metarhizium	anisopliae
2956A	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	virens
2958A	Ascomycota	Hypocreales	Trichoderma	hamatum
2958B	Ascomycota	Hypocreales	Trichoderma	sp.
2958C	Ascomycota	Mucorales	Mucor	racemosus
2959F	Ascomycota	Hypocreales	Nectria	lungdunensis
2959G	Ascomycota	Hypocreales	Harposporium	janus
3010E	Ascomycota	Ophiostomatales	Sporothrix	lignivora
3010F	Ascomycota	Microascales	Graphium	basitruncatum
3010G	Ascomycota	Dothideomycetes	Arthrographis	cuboidea
3014D	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	virens
3016G	Ascomycota	Botryosphaerales	Lasiodiplodia	parva
3016H	Ascomycota	Hypocreales	Fusarium	sp.
3018F	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	virens
3079H	Ascomycota	Diaporthales	Phomopsis	columnaris
3079I	Basidiomycota	Agaricales	Coprinellus	sp.
3079J	Ascomycota	Hypocreales	Cosmospora	coccinea
3081I	Ascomycota	Hypocreales	Trichoderma	asperellum
3081J	Ascomycota	Xylariales	Pestalotiopsis	microspora
3081K	Basidiomycota	Agaricales	Coprinellus	disseminatus
3081M	Ascomycota	Hypocreales	Lanatonectria	flocculenta
3083E	Ascomycota	Hypocreales	Hypocrea	jecorina

Anexo 7. Taxonomía de las bacterias aisladas de intestinos de larva de coleóptero

Aislamiento	Phylum	Orden	Genero	Especie
2553G	Proteobacteria	Xanthomonadales	Dyella	japonica
2553H	Actinobacteria	Actinomycetales	Leucobacter	iarius
2553I	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonas	parahominis
2554I	Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	tumefaciens
2555E	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	lactis
2555H	Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	radiobacter
2556G	Actinobacteria	Actinomycetales	Leifsonia	sp
2556H	Proteobacteria	Sphingomonadales	Novosphingobium	sp
2556N	Fusobacteria	Fusobacteriales	Sebaldella	termitidis
2556P	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	lactis
2556V	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	sp
2556W	Proteobacteria	Xanthomonadales	Stenotrophomonas	maltophilia
2556Y	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
2557K	Actinobacteria	Actinomycetales	Leucobacter	iarius
2557L	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	casseliflavus
2559G	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	sp
2574E	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2574F	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	lactis
2574G	Firmicutes	Bacillales	Staphylococcus	epidermidis
2574N	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
2574O	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2575H	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	subtilis
2576F	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2576G	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	casseliflavus
2576J	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2577E	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2577F	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2577H	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacterium	oxydans
2577J	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
2577K	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	pumilus
2577L	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	casseliflavus
2577M	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	sp
2579C	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2855B	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2855F	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcus	sp

2855G	Actinobacteria	Actinomycetales	Arthrobacter	sp
2855H	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacterium	oxydans
2861C	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	lactis
2861D	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	garvieae
2865B	Firmicutes	Lactobacillales	Lactococcus	lactis
2890A	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
2890B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Klebsiella	pneumoniae
2891A	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
2891B	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2891D	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
2892A	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2892C	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
2893A	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
2893C	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	sp
2894A	Proteobacteria	Enterobacteriales	Citrobacter	farmeri
2894B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Klebsiella	sp
2894C	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
2894D	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	aerogenes
2922C	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
2922D	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2922G	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
2924A	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2924C	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
2924D	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	sp
2924E	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
2924K	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2926A	Proteobacteria	Burkholderiales	Achromobacter	sp
2926B	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	sp
2926C	Proteobacteria	Enterobacteriales	Citrobacter	farmeri
2926D	Proteobacteria	Enterobacteriales	Citrobacter	koseri
2926H	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomyces	sp
2956E	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2956F	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	citronellolis
2958D	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	entomophila
2958E	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
2958F	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
2958G	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	sp
2959A	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens

2959B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	aerogenes
2961C	Proteobacteria	Enterobacteriales	Klebsiella	aerogenes
2961D	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
2961F	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	citronellolis
2961G	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
3010A	Bacteroidetes	Flavobacteriales	Chryseobacterium	sp
3010B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	hormaechei
3010D	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
3016A	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	sp
3016B	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	aeruginosa
3016D	Proteobacteria	Enterobacteriales	Klebsiella	pneumoniae
3016E	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
3016F	Proteobacteria	Alteromonadales	Alishewanella	jeotgali
3018A	Proteobacteria	Burkholderiales	Achromobacter	sp
3018B	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
3018C	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
3020B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
3020C	Firmicutes	Bacillales	Paenibacillus	sp
3020F	Actinobacteria	Actinomycetales	Tsukamurella	pulmonis
3022C	Proteobacteria	Burkholderiales	Achromobacter	sp
3079A	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	entomophila
3079B	Proteobacteria	Enterobacteriales	Serratia	marcescens
3079C	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacter	aerogenes
3079D	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
3079F	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
3079G	Proteobacteria	Pseudomonadales	Acinetobacter	sp
3081C	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	macroides
3081D	Proteobacteria	Xanthomonadales	Enterobacter	aerogenes
3081E	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	cereus
3081F	Proteobacteria	Xanthomonadales	Pseudomonas	citronellolis
3081G	Firmicutes	Bacillales	Bacillus	sp
3083A	Firmicutes	Bacillales	Paenibacillaceae	sp
3083B	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	entomophila
3083C	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	citronellolis
3083D	Proteobacteria	Xanthomonadales	Stenotrophomonas	maltophilia
3083F	Proteobacteria	Enterobacteriales	Citrobacter	farmeri
