



ARTÍCULO ORIGINAL

INTERACCIÓN DE MICROBIOTAS BACTERIANAS E INSECTOS

Adriana Vargas Jerez^{1,3}, Rafael José Vivero^{1,2}, Sandra Uribe²,
Claudia Moreno³, Gloria Cadavid Restrepo³

¹. Estudiante posgrado en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ². Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ³. Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Correo electrónico: gecadavi@unal.edu.co

No es una casualidad que “Science” una de las más prestigiosas revistas de ciencia a nivel mundial haya realizado en junio de este año, una separata completa de los últimos avances sobre los microbiomas: “*la interacción entre la microbiota y su nicho específico*”. Los microorganismos representan la mayoría de la vida de la tierra, presentes en todos los ambientes, sobre y bajo la superficie, en los océanos, en la atmósfera y dentro de los organismos multicelulares. El hombre representa claramente este ejemplo, donde la microbiota tiene un papel crítico en diversas áreas como salud pública, agricultura, energía y medio ambiente. Tal es este efecto que se estima que la microbiota intestinal humana contribuye con el 36% de las moléculas pequeñas que se encuentran en la sangre humana y también juega un papel importante en la creación de la susceptibilidad a ciertas enfermedades (Hood 2012).

Proyectos como el microbioma humano y el microbioma terrestre se crearon recientemente para responder a preguntas como ¿Qué hace un microbio individualmente?, ¿cómo interactúan las comunidades de microorganismos para modificar el medio ambiente? ¿Cómo rediseñar microbios y sus comunidades para que ejecuten tareas y soporten los desafíos de las comunidades modernas? El secuenciamiento del DNA de última generación y los estudios funcionales han comenzado a

revelar la importancia de estos habitantes internos para nuestra evolución, desarrollo, metabolismo, sistema inmune, susceptibilidad a infecciones y enfermedades (Hood 2012, Mueller et al. 2012).

La microbiota intestinal se puede definir como la comunidad de microbios que viven en el tracto intestinal de un individuo, de forma intracelular (células especializadas) o extracelular (vida libre), representada por bacterias, virus, hongos, nematodos entre otros endosimbiontes (Gordon 2012). La composición y actividad de la microbiota intestinal se desarrolla conjuntamente con el hospedero desde su nacimiento y está sujeta a complejas interacciones que dependen del genoma, nutrición y estilo de vida del hospedero. La microbiota intestinal está involucrada en la regulación de múltiples vías metabólicas en el hospedero, dando lugar a una señalización metabólica interactiva e inmunoinflamatoria entre el hospedero y su microbiota, ejes que fisiológicamente conectan el intestino, el músculo y el cerebro. Un entendimiento más profundo de estos ejes, es un prerrequisito para optimizar estrategias terapéuticas para la manipulación de la microbiota intestinal dirigidas hacia combatir enfermedades y mejorar la salud (Nicholson et al. 2012).

En insectos, varios estudios también han avanzado en el conocimiento de las comunidades microbianas y su influencia sobre su hospedero principalmente de aquella que se encuentra en el intestino. Se sabe por ejemplo que el éxito de la producción agrícola es fuertemente dependiente de las abejas polinizadoras y que la variabilidad de la microbiota debido a cambios ambientales, pesticidas y presión de patógenos puede

llevar a grandes pérdidas poblacionales. Estudios metagenómicos de la microbiota de abejas ha demostrado su papel en la nutrición y salud de estos insectos, con actividad importante sobre el metabolismo de los carbohidratos y la dieta. Interesante notar que una nueva especie, *Snodgrassella* junto a *Gilliamella*, protegen a esta especie de la invasión bacteriana principalmente en el intestino y en el recto (Engel et al. 2012). Los primeros trabajos en esta especie fueron realizados por García y colaboradores en 2006, cuando se caracterizaron los microorganismos cultivables asociados con *Apis mellifera* a partir de polen almacenado y transportado en corbículas y tracto digestivo de las abejas (forrajeras y recién nacidas), aislando bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Arthrobacter* y hongos de los géneros *Rhizopus*, *Alternaria* y *Epicoccum*, que de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, algunas de estas bacterias pueden estar involucradas en la degradación de los compuestos de la capa externa del polen y son adquiridas por las abejas a través del alimento y contacto con otros individuos de la colmena. Estudios para analizar la disminución en las poblaciones de la mariposa monarca *Danaus plexippus* también han sido realizados, en donde se ha descrito que los principales grupos bacterianos nativos encontrados en el abdomen son *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Pasteurella* spp. (Bravo 2009). Otro ejemplo de una bacteria simbionte intracelular de especial importancia es *Wolbachia pipientis*, extremadamente común en muchos organismos incluyendo *Drosophila melanogaster* y muy conocida por su habilidad para inducir alteraciones reproductivas

en sus hospederos, tales como muerte de los machos, feminización, partenogénesis e incompatibilidad citoplasmática; estas alteraciones pueden promover especiación en casos extremos (Cho et al. 2011)

Las bacterias existen naturalmente en el intestino de insectos silvestres y en cautiverio, y se adquieren mediante la ingesta de azúcares (néctar, savia, secreciones de áfidos, soluciones azucaradas contaminadas en laboratorio), obtención de sangre (alimentación artificial, fuentes de alimentación silvestre o experimental) y a través de materia orgánica en descomposición utilizada como alimento (heces de animales, lignina, hojarasca acumulada, basuras acumuladas) (Hurwitz et al. 2011, McCarthy et al. 2011). El hecho de que los insectos se alimenten de una amplia variedad de dietas es porque muchas de estas presentan deficiencias nutricionales y son de difícil digestión por causa de moléculas complejas, en este sentido las bacterias del tracto digestivo son necesarias para la desintoxicación del material vegetal y para favorecer la disponibilidad de Fe^{++} de los eritrocitos, de los aminoácidos esenciales y de vitaminas como el complejo B (Shu et al. 2010).

La interacción microbio-hospedero también es conocida como metaorganismo (Bosch y McFall-Ngai 2011). La importancia de conocer la microbiota total y existente en el intestino de los insectos, no es únicamente por el conocimiento de la comunidad bacteriana total, sino también por el hecho que muchos microorganismos pueden tener un papel determinante sobre la reproducción, inmunidad, sobrevivencia y en el desarrollo de los parásitos especialmente

cuando se trata de insectos vectores de enfermedades tropicales como malaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, filariasis, dengue, etc. (Azambuja et al. 2005a, Genes et al. 2011). Adicionalmente, estudiar las comunidades microbianas transitorias o residentes del tracto digestivo de los insectos vectores puede contribuir a entender las variaciones anuales o regionales registradas para la enfermedad; modular el desarrollo o alterar el ciclo de transmisión del parásito, bloquear el ciclo de vida del insecto (alteración de longevidad), incrementar la acción de los insectos por determinados hospederos mamíferos, o actuar como película para prevenir la colonización de otros patógenos como los hongos entomopatógenos (Cirimotich et al. 2011, Vallet-Gely et al. 2011, Weiss y Aksoy 2011).

En los insectos transmisores de parásitos y virus a humanos de diversos géneros como *Lutzomyia*, *Aedes*, *Triatoma*, *Culex* y *Anopheles*, el primer punto de contacto entre los parásitos ingeridos con la sangre del hospedero y los vectores comienza en la superficie epitelial de su tracto digestivo, principalmente el intestino (barrera innata inespecífica y fisiológica). Es en este punto que los parásitos deben cambiar a otros estadios y tienen su primera oportunidad de unión e invasión de los tejidos del vector (matriz peritrófica, peptidoglicanos), pero es aquí también que la microbiota funciona como la primera barrera. Muchos parásitos sufren reducciones importantes en número considerable debido al ataque directo de la microbiota nativa, en especial de bacilos Gram negativos (Azambuja et al. 2005a), indicando que aquella población parasitaria sobreviviente se encargará de la infección

en un próximo hospedero (Azambuja et al. 2004). Los factores responsables de la reducción drástica de parásitos han sido poco entendidos; sin embargo, en el intestino de los insectos vectores se incluyen enzimas, lectinas, óxido nítrico y complejos de peroxidasa, activados por su mecanismo de defensa (celular, humoral) o bien por las bacterias que pueden impedir el completo desarrollo de los parásitos (Hoffmann 1997, Whitten et al. 2007, Zientz et al. 2004), al exponer moléculas o estructuras tóxicas (proteasas, hemolisinas, sideróforos, factores antitripanosomales, prodigiosina, catepsinas, lipasas, glicosidasas) o bien activar la producción de aglutininas, trialisinas, defensinas, AMP, ROS y competir por peptidoglicanos (Vallet-Gely et al. 2008). Este evento ha sido bien descrito para los mosquitos transmisores de la malaria, en donde menos de la mitad de los miles de gametocitos de *Plasmodium* spp., ingeridos sobreviven debido al sistema inmune propio del hospedero y a los microorganismos existentes naturalmente en el intestino medio (Azambuja et al. 2005a).

Las bacterias del intestino medio de diversas especies de mosquitos han sido identificadas encontrando bacterias Gram negativas dominantes incluyendo *Serratia marcescens*, *K. ozaenae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., además se han descrito algunas bacterias Gram-positivas como *Enterococcus faecalis*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Streptomyces coelicolor*, *Propionibacterium acnés* y *Bacillus thuringiensis* (Azambuja et al. 2004). El hecho de encontrar más bacterias Gram negativas se puede deber de alguna forma al método de cultivo aerobio en agar LB usado común-

mente, el cual es más selectivo para este grupo bacteriano. Este tipo de cultivo tiene algunas limitaciones para proporcionar la composición completa de la microbiota intestinal ya que, además del sesgo, gran parte de las bacterias no pueden ser cultivadas, similar a lo que se reporta con la microbiota intestinal humana (Dong et al. 2009). En insectos hematófagos como los triatomíneos, Figueiredo et al. (1995) identificaron diversos géneros de bacterias que incluyen *E. cloacae*, *S. marcescens* y *E. faecalis* en ocho especies de triatomíneos en condiciones de laboratorio (Azambuja et al. 2004).

Las bacterias encontradas en estos vectores pueden estar modulando la infección de los parásitos. Por ejemplo, se ha encontrado que la bacteria simbiote *S. glossinidius* en la mosca tsetse produce un inhibidor de azúcares que neutraliza la actividad antitripanocida de la lectina del intestino, haciendo que se mejore el desarrollo de las formas tripanosomatídeas (Azambuja et al. 2005a). Pumpuni et al. (1993, 1996) sugieren que las bacterias libres del intestino modifican el ambiente intestinal haciendo con que se inhiba el desarrollo del parásito o que se proporcione una respuesta inmune de defensa. La respuesta inmune se puede deber también a la producción de péptidos antimicrobianos contra parásitos o contra otras bacterias no simbiotes. También fue descrito que en *A. stephensi* infectado con *P. falciparum*, la alta concentración de bacterias gram-negativas bloquean la formación de oocistos (Dong et al. 2009, Pumpuni et al. 1993, 1996). Otra posibilidad es que las bacterias formen una barrera física que bloquee el acceso de los parásitos al epitelio, este es un mecanismo común por el cual la

microbiota de los vertebrados protege contra la infección de bacterias patógenas (Dong et al. 2009).

Las bacterias del género *Serratia* han sido comúnmente asociadas a muchos órdenes de insectos, y se localizan en el intestino medio de insectos hematófagos como *Rhodnius prolixus*, *A. triseriatus*, *C. pipiens*, *Psoropora columbiae*, *A. gambiae*, *A. funestus*, *A. albimanus*, *Phlebotomus papatasi* y *L. longipalpis*. La bacteria *S. marcescens* se ha encontrado en insectos vectores, es considerada una bacteria patógena facultativa, pues carece de la capacidad de invadir el hemocele de insectos sanos; sin embargo, ha sido reportado que tiene efecto tóxico sobre la población de parásitos de *T. cruzi*, lo que demuestra que está involucrada en la interacción de bacterias y parásitos (Azambuja et al. 2004). La disminución de esta población parasitaria está relacionada directamente con la producción de una sustancia hemolítica por parte de varias especies del género *Serratia*. Esa sustancia se conoce como prodigiosina, un pigmento insoluble en agua que está relacionada con la muerte de los parásitos por inducir daño mitocondrial, además se ha observado que induce apoptosis en líneas celulares cancerígenas y tiene actividad antimalárica (Azambuja et al. 2005b, Genes et al. 2011, Montaner et al. 2000).

En la actualidad, el uso de técnicas moleculares han mejorado los análisis de identificación y función de los ecosistemas microbianos (Van Hamme et al. 2003). La ecología microbiana se basa en la amplificación directa y el secuenciamiento del gen ribosomal 16S rDNA a partir de cualquier muestra ambiental (Case et al. 2007). Los genes ribo-

somales son considerados excelentes marcadores moleculares ya que mantienen las características conservadas de todos los genomas bacterianos durante la evolución. La metodología de identificación bacteriana mediante la amplificación por PCR, seguida de electroforesis es fácil y simple. El secuenciamiento de las bandas obtenidas de la amplificación, permite detectar cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Van Hamme et al. 2003). Otras técnicas que se vienen implementando para analizar la riqueza de las comunidades microbianas son la electroforesis en gel de gradiente de denaturación y temperatura (DGGE, TGGE), la secuenciación de nueva generación o pirosecuenciación, el empleo de herramientas bioinformáticas (BlastN, Lasergene, Check-Chimera/Bellorophon, Phyllip, DOTUR, MOTUR, MIRA, Phrap, Metasim, Dogma). Este enfoque permite la determinación de las secuencias de nucleótidos de ADN o ARN, estructura y función de los genes y caracterización genética de la diversidad de los individuos presentes en una muestra sin tener que aislar y cultivar las especies individuales (Rondon et al. 2000), además de hacer estimativos de diversidad (Shannon-Weaver; Simpson), abundancia (estimador de cobertura ACE, sesgo de corrección CHAO1) y curvas de rarefacción (acumulación de especies). Los enfoques independientes de cultivo se están utilizando en gran medida para identificar comunidades microbianas como una estrategia de manipulación paratransgénica (Hillesland et al. 2008). Las técnicas de las diferentes «ómicas» como el análisis de metagenomas junto con los recientes avances en secuenciación, proporcionan información que permiten análisis en profundidad de la diversidad microbiana

y de los procesos biológicos al interior de los insectos, como la degradación de la biomasa; además, del estudio de la expresión génica, con métodos de análisis en metatranscriptómica y metaproteómica (Shi et al. 2010). La integración de los datos a nivel de las diferentes «ómicas» y la caracterización usando un enfoque independiente de cultivo son elementos que permitirán la comprensión del papel funcional de la microbiota, la supervivencia y transmisión de patógenos en el insecto.

El conocimiento tanto de las bacterias como de las sustancias producidas por estas puede ser una estrategia para el control biológico de los insectos vectores y el tratamiento de las enfermedades tropicales causadas por virus y parásitos (Da Mota et al. 2012). Una aproximación para la prevención de enfermedades transmitidas por insectos vectores es el uso de bacterias genéticamente transformadas que expresen actividad antiparasitaria. Lindh et al. (2005) identificaron las bacterias intestinales de mosquitos *A. gambiae* y *A. funestus* basado en el gen 16S rRNA, revelando nuevas especies relacionadas con simbiontes conocidos y buscando el uso de estas como simbiontes transgénicos que lleven para dentro de los mosquitos toxinas antiparasitarias. Beard y Cols (2002) sugirieron el uso de la bacteria simbiote en *R. prolixus*, *Rhodococcus rhodnii* genéticamente transformado, para la expresión de moléculas tripanolíticas. En *C. quinquefasciatus*, mosquito vector de *Wuchereria bancrofti*, causante de filariasis, enfermedad que ocupa el sexto lugar de importancia dentro del grupo de las enfermedades tropicales, han sido consideradas también las alternativas para manipular las bac-

terias simbiontes del intestino medio y usarlas como control de la enfermedad; los estudios iniciales parten del análisis de la microbiota intestinal a partir de la investigación genética del gen 16S rDNA (Pidiyar et al. 2004).

Al conocer las comunidades de bacterias se pueden también dirigir estrategias de control vectorial bajo un enfoque paratransgénico, de aplicación residual o de implementación de péptidos con futura actividad tripanosomal (vacuna o tratamiento). Para esto es necesario contemplar algunos requisitos o funcionalidad de la bacteria objeto aislada del tracto digestivo de los insectos vectores, dentro de los cuales se destacan en lo posible: no representar una amenaza ambiental, no ser patogénicas para humanos, contar con actividad biofertilizante (manejo ambiental), tener un paso transtadial de estados inmaduros a adultos, poder realizar transferencia horizontal de genes, óptima asimilación por vía coprofágica, tener la capacidad de expresar moléculas anti-protozoaria o de bloquear el ciclo de vida del insecto (Durvasula et al. 1999, Hurwitz et al. 2011).

LISTA DE REFERENCIAS

- Azambuja P, Feder D, García E. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology* 107: 89-96
- Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N. 2005a. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology* 21(12): 568-572.

- Azambuja P, García E. 2005b. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus* - A mini review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(5): 567-572.
- Beard C, Cordin-Rosales C, Durvasula R. 2002. Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology* 47: 123-141.
- Bosch T, McFall-Ngai M. 2011. Meta-organisms as the new frontier. *Zoology* 114: 185-190.
- Bravo J. 2009. Tesis de Doctorado: Estudio de la microbiota asociada a la mariposa monarca *Danaus plexippus* durante la hibernación en los bosques mexicanos. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de estudios de Posgrado en Investigación. México, D.F. 98 p.
- Case R, Boucher Y, Dahllo I, Holmstrom C, Doolittle F, Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 278-288.
- Cho K, Kim G, Lee O. 2011. *Wolbachia* bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. *PLoS ONE* 6(7): e22703.
- Cirimotich C, Ramirez J, Dimopoulos D. 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host and Microbe* 10(4): 307-310.
- da Mota F, Marinho L, Moreira C, Lima M, Mello C, Souza-Garcia E, Carels N, Azambuja P. 2012. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(5): e1631.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the mosquito mid-gut microbiota in the defense against Malaria parasites. *PLoS Pathogens* 5(5): e1000423.
- Durvasula A, Gumbs A, Kruglov J, Taneja A, Kang C, Cordon-Rosales F, et al. 1990. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 115-119.
- Engel P, Martinson V, Moran N. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceeding of the National Academy of Science*. 109(27): 11002-11007.
- Figueiredo A, Nunes Z, Silva A, Giordano-Dias C, Coura J, Hofer E. 1995. Isolation of microorganisms of triatomines maintained in artificial and sylvatic conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 218-241.
- García D, Rojas M, Sánchez J. 2006. Cultured microbiological content of the intestinal tract and stored pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana* 11(1): 123-129.
- Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya J, Triana O. 2011. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasites and Vectors* 4:66. 1-8

- Gordon J. 2012. Honor thy gut symbionts redux. *Science* 336: 1251-1253.
- Hood L. 2012. Tackling the microbiome. *Science* 336: 1209.
- Hoffmann. 1997. Immune responsiveness in vector insects. *Proceeding of the National Academy of Science*. 94: 11152-11153.
- Hillesland H, Read A, Subhadra B, Hurwitz I, McKelvey R, Ghosh K, Das P, Durvasula R. 2008. Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(6): 881-886.
- Hurwitz I, Hillesland H, Fieck A, Das P, Durvasula R. 2011. The paratransgenic sand fly: A platform for control of *Leishmania* transmission. *Parasites and Vectors* 4(1): 82.
- Lindh J, Terenius O, Faye I. 2005. 16S rRNA gene-based identification of mid-gut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 7217-7223.
- McCarthy C, Diambra L, Rivera R. 2011. Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral Leishmaniasis, using an unbiased high-throughput Approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(9): e1304.
- Montaner B, Navarro S, Pique M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Peres-Tomas R, 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology* 131: 585-593.
- Mueller K, Ash C, Pennisi E, Smith O. 2012. The gut microbiota. *Science* 336: 1245.
- Nicholson J, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336: 1262-1267.
- Pidiyar V, Jangid K, Patole M, Shouche Y. 2004. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70(6): 597-603.
- Pumpuni C, Beier M, Nataro J, Guers L, Davis J. 1993. *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Experimental Parasitology* 77: 195-199.
- Pumpuni C, DeMaio J, Kent M, Davis J, Beier J. 1996. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54: 214-218.
- Rondon M, Bettermann A, Brady S. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2541-2547

Shi W, Syrenne1 R, Sun J-Z, Yuan JS. 2010. Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age. *Insect Science* 17: 199-219.

Shu Q, Amber G, Geoffrey G, Malcolm K. 2010. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes?. *Parasites and Vectors* 3:108.

Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F. 2011. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature*. 6: 302-313.

Van Hamme J, Singh A, Ward O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 503-549.

Weiss B, Aksoy S. 2011. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in Parasitology* 27 (11). 514-522

Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N. 2007. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 440-452.

Zientz E, Dandekar T, Gross R. 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (4): 745-770.

