

# Comunidades bacterianas del intestino de escarabajos peloteros y del suelo en sucesión en la Reserva Tapichalaca

## *Bacterial communities of dung beetle guts and of sucesional soil in Tapichalaca Reserve*

Daniela Román-Cáceres<sup>1,2,\*</sup>, Heidy Jiménez-Granda<sup>1</sup> y Aura Paucar-Cabrera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Museo de Zoología-LOUNAZ, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

<sup>2</sup> Grupo de Investigación de Genética y Biología Molecular, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador

\* Autor para correspondencia: [daniela.roman@unl.edu.ec](mailto:daniela.roman@unl.edu.ec)

Fecha de recepción del manuscrito: 03/03/2023    Fecha de aceptación del manuscrito: 05/05/2023    Fecha de publicación: 30/06/2023

**Resumen**—El suelo es un ecosistema importante en el que diferentes especies bacterianas desempeñan un papel fundamental como bioindicadores de su comportamiento ecológico y evolutivo. En el presente estudio se aislaron y caracterizaron morfológicamente comunidades bacterianas de la microbiota intestinal de escarabajos peloteros (Coleoptera: Scarabaeinae) y del suelo de tres estados de sucesión ecológica (Bosque Primario, Bosque Restaurado y Pastizal en Restauración) de la Reserva Natural Tapichalaca (Ecuador). Se llevó a cabo el aislamiento bacteriano de muestras de suelo y de intestino de escarabajos mediante la inoculación de cultivos mixtos y puros en dos medios de cultivo: Agar Nutritivo y Agar Tripticasa de Soya. La identificación morfológica de las colonias bacterianas se realizó a través de la observación de características macroscópicas y la identificación de las células bacterianas mediante Tinción Gram y observación microscópica. Las cepas bacterianas obtenidas en el aislamiento de consorcios bacterianos de las muestras del intestino de los escarabajos y de las muestras de suelo, se asociaron a diferentes posibles géneros bacterianos y se logró concluir que existe variación entre algunos de los géneros identificados en relación con los tres estados de sucesión ecológica. En las muestras intestinales de escarabajos, de los cinco posibles géneros asignados, el género *Clostridium* se identificó en el Bosque Primario y *Enterobacter* en la muestra intestinal de un espécimen del pastizal. En las muestras de suelo, el género *Corynebacterium* se asoció en la muestra de suelo del Bosque Primario y *Pseudomonas* en la muestra de suelo del pastizal.

**Palabras clave**—Microbiota, Identificación, Géneros bacterianos, Scarabaeinae.

**Abstract**—Soil is an important ecosystem in which different bacterial species play a fundamental role as bioindicators of its ecological and evolutionary behaviour. In the present study, bacterial communities were isolated and morphologically characterized from the intestinal microbiota of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) and from the soil of three states of ecological succession (primary forest, restored forest and grassland under restoration) of the Tapichalaca Nature Reserve (Ecuador). Bacterial isolation from soil and beetle intestine samples was carried out by inoculating mixed and pure cultures in two culture media: Nutrient Agar and Trypticase Soy Agar. The morphological identification of the bacterial colonies was carried out through the observation of macroscopic characteristics and the identification of the bacterial cells through Gram staining and microscopic observation. The bacterial strains obtained in the isolation of bacterial consortia from the beetle intestine samples and from the soil samples were associated with different possible bacterial genera and it was possible to conclude that there is a variation between some of the genera identified in relation to the three states of ecological succession. In the intestinal samples of beetles, of the five possible genera assigned, the genus *Clostridium* was identified in the primary forest and *Enterobacter* in the intestinal sample of a specimen from the grassland. In the soil samples, the genus *Corynebacterium* was associated in the soil sample from the primary forest and *Pseudomonas* in the soil sample from the grassland.

**Keywords**—Microbiota, Identification, Bacterial genera, Scarabaeinae.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias cumplen un rol valioso como bioindicadores del estado o de la perturbación del suelo. Estos microorganismos responden rápidamente a las perturbaciones ambientales y son actores fundamentales en los ciclos

biogeoquímicos y la descomposición de la materia orgánica, por lo tanto, su composición puede ser valiosa para valorar el funcionamiento del ecosistema (Gu et al., 2018).

Además de estar asociadas a diversas funciones medioambientales, las bacterias también se encuentran relacionadas al funcionamiento intestinal de los animales, un caso es la inter-

acción simbiótica que tienen con los escarabajos. Los escarabajos proporcionan hospedaje y protección a las bacterias que se encuentran en su interior y, por su parte, las bacterias participan en el proceso de digestión de los escarabajos y les proporcionan protección contra patógenos, lo cual les ayudan a desarrollar la capacidad de adaptarse a los constantes cambios ambientales (Chouaia *et al.*, 2019; Estes *et al.*, 2013).

Existen estudios que mencionan la importancia de este tipo de interacciones como la realizada por Falqueto *et al.* (2022), donde se evaluó la presencia de hongos y bacterias en la microbiota del intestino medio y posterior de escarabajos saproxilófagos en fase larvaria de la especie *Pelidnota luridipes* Blanchard (Scarabaeidae: Rutelinae). Lograron identificar 57 especies bacterianas y 7 especies de hongos, con diferente composición y abundancia según su ubicación en el intestino, lo que indicaba que la presencia de microbios en las cámaras intestinales puede correlacionarse con la colonización y función de los microorganismos en cada hábitat. Los autores recomiendan realizar nuevas investigaciones con escarabajos de esta y otras especies cercanas para determinar microbiota asociada a diferentes estados larvarios y encontrar especies transitorias y residentes del intestino de estos insectos y descubrir su potencial probiótico.

El objetivo principal de este estudio es el de aislar comunidades benéficas tanto del suelo como del intestino de escarabajos, ya que ambos organismos presentan beneficios al ecosistema edáfico. Se conoce que el suelo puede albergar una comunidad diversa de escarabajos y microorganismos que se alimentan de excrementos, lo que permite una rápida eliminación de los desechos animales depositados y la muerte o antagonismo de cualquier patógeno presente. Por ejemplo, los escarabajos peloterios (Coleoptera: Scarabaeidae) son capaces de eliminar rápidamente los excrementos del ganado en pastizales (Losey & Vaughan, 2006), y se ha sugerido que también suprimen los patógenos presentes en los excrementos. Además, los microorganismos del suelo también contribuyen a la descomposición de los excrementos (Chu *et al.*, 2007), suprimen comúnmente los patógenos de las plantas a través de la competencia y el antagonismo químico (Weller *et al.*, 2002) y dificultan la persistencia de microorganismos patógenos que afectan la salud humana (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016).

La comprensión del rol que desempeñan las bacterias en el suelo y en el intestino de los escarabajos estercoleros es de vital importancia para los estudios de regeneración ambiental, como lo es la restauración ecológica. Por ello, existe un interés creciente en estudiar y comprender las respuestas de las comunidades bacterianas del suelo bajo la restauración ecológica (Yu *et al.*, 2021). Los modelos de sucesión ecológica pueden ser comparados mediante el cambio en el número de los taxones y la variabilidad entre las comunidades locales dentro de una región o hábitat determinados, ya sea entre las etapas de sucesiones iniciales o avanzadas. Al considerar que las trayectorias sucesionales pueden ser muy irregulares y no lineales, dependiendo de sus características ambientales, no se espera que las comunidades bacterianas sean iguales (Ortiz-Álvarez *et al.*, 2018).

El presente trabajo investigativo pretende generar información sobre el desarrollo de consorcios bacterianos en el suelo y en el intestino de los escarabajos estercoleros (Coleoptera:

Scarabaeinae) que habitan en diferentes estados de sucesión del bosque de la Reserva Natural Tapichalaca, del cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

El presente estudio se llevó a cabo en Ecuador, en la provincia de Zamora Chinchipe, cantón Palanda, en la Reserva Natural Tapichalaca perteneciente a la Fundación Jocotoco. Cuenta con un área de 3624 hectáreas y se encuentra en las coordenadas Latitud -4,48333, Longitud -79,13333 (Fundación Jocotoco, 2022). Se seleccionaron tres áreas de sucesión ecológica: área de Bosque Primario (Lat: -4,49165; Long: -79,12563), área de Bosque Restaurado con 23 años en proceso de restauración (Lat: -4,51165; Long: -79,13763) y área de Pastizal en Restauración con 15 años en proceso de restauración (Lat: -4,50535; long: -79,13322). La cobertura vegetal Pastizal en Restauración se refiere a varias áreas que eran usadas para la ganadería que desde hace 15 años se dejaron de usar con ese fin y se destinaron para la restauración pasiva; sin embargo, en esta cobertura vegetal aún se presenta la estructura de vegetación herbácea tipo pastizal, por lo cual se mantiene la denominación de Pastizal en Restauración. En cada estado de sucesión se estableció una parcela de 10 m x 10 m, subdividida en 4 cuadrantes de 5 m x 5 m y mediante sorteo aleatorio se eligió una subparcela, la cual a su vez se subdividió en subparcelas de 1 m x 1 m y aleatoriamente se establecieron tres puntos de muestreo.

En el mes de febrero de 2022 se realizó un solo muestreo por tipo de sucesión el cual fue monitoreado durante 24 horas. La captura de los escarabajos se llevó a cabo mediante trampas de caída (pitfall) modificadas, cebadas con heces humanas, según Da Silva y Hernández (2015). Las modificaciones consistieron en colocar el cebo en un vaso plástico elevado para evitar que el excremento pudiera entrar en contacto con los escarabajos y alterar los resultados. El recipiente enterrado contenía suelo del mismo sitio de muestreo, de manera que los escarabajos capturados permanecían vivos hasta llegar al laboratorio. La boca del recipiente contenía un embudo para evitar que los escarabajos salieran del recipiente, y la trampa estaba protegida de la lluvia con un plato plástico para evitar contaminación del cebo hacia el recipiente enterrado en caso de precipitación. Una vez capturados los escarabajos vivos se desenterraron los recipientes, se colocaron tapas agujereadas y se etiquetaron todos los recipientes de colecta por punto de muestreo. Todos los especímenes colectados se trasladaron al Museo de Zoología de la Universidad Nacional de Loja (LOUNAZ), con el fin de realizar la selección aleatoria de los especímenes para la extracción del intestino. Mediante una identificación rápida se seleccionaron a los individuos del género más representativo y se eligieron mediante sorteo aleatorio dos individuos de dos de los tres puntos de muestreo por cada estado de sucesión. Los escarabajos fueron identificados usando la colección de referencia de escarabajos del Museo de Zoología LOUNAZ de muestreos en la Reserva Tapichalaca, con la clave de Chamorro *et al.* (2018) y la confirmación de identificaciones hasta nivel de especie por el especialista Fernando Vaz de Mello.

El muestreo del suelo se llevó a cabo en los mismos pun-

tos seleccionados para el muestreo de escarabajos, se tomaron tres muestras (A, B, C) a 20 cm de profundidad y fueron homogeneizadas entre sí para obtener una sola muestra compuesta por estado de sucesión (Gu et al., 2018). Se depositaron en una funda Ziploc con su respectiva etiqueta para llevarlas al laboratorio. Se dejaron secar las muestras de suelo durante 48 h a temperatura ambiente.

### **Material biológico obtenido del muestreo de escarabajos estercoleros y del suelo**

Para la obtención de las muestras de intestino, se sacrificó a los escarabajos mediante enfriamiento a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, se los desinfectó con alcohol al 70 % durante 3 minutos, y fueron enjuagados en agua estéril para evitar contaminación (Arias-Cordero et al., 2012). En la cámara de flujo laminar con la finalidad de mantener un ambiente estéril se procedió a realizar la disección del intestino: empleando una aguja de microcirugía se realizó un corte en la base de su abdomen y se extrajo el intestino (intestino anterior - recto) con una pinza esterilizada con alcohol al 70 % y calor (Schloss et al., 2006; Vasanthakumar et al., 2008).

La muestra de intestino fue colocada en un tubo criovial con 2 ml de agua de peptona y se trituró por dos minutos con la ayuda de una varilla de agitación desinfectada, luego se agitó en el vórtex por 20 segundos para homogeneizar la muestra, misma que fue considerada como muestra madre a partir de la cual se procedieron a realizar siete diluciones seriadas con factor 1:4 siguiendo la metodología mencionada por (Heylen et al., 2012) que explica que con una dilución alta se logra una distribución más uniforme en placas de agar. Se agregó 0,5 ml de muestra madre en un tubo Eppendorf con 1,5 ml de agua de peptona autoclavada y se homogeneizó durante 20 segundos, siendo esta la primera dilución ( $10^{-1}$ ). El proceso fue el mismo hasta obtener la séptima dilución ( $10^{-7}$ ).

Las tres muestras compuestas de suelo una vez secas se tamizaron, de cada una se pesaron 10 g para mezclar en 90 ml de agua estéril y obtener la muestra madre. El proceso se realizó con cada muestra de suelo, por separado; las muestras madres se homogeneizaron durante 20 minutos (Sansupa et al., 2021). A partir de las tres muestras madre homogeneizadas, se hicieron cinco diluciones seriadas ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ) (Castañeda Briones, 2003)

### **Análisis de Temperatura y pH**

La metodología utilizada en este estudio se centró en la toma de parámetros in situ de temperatura ( $T^{\circ}$ ) y pH del suelo con el objetivo de investigar su influencia en la actividad de las bacterias del suelo. Para la medición de la temperatura, se utilizaron sondas enterradas a diferentes profundidades en las parcelas de muestreo. El pH del suelo se determinó en la mezcla compuesta de cada área con un pHmetro calibrado. Las muestras de suelo se mezclaron y se les añadió agua destilada para obtener una suspensión homogénea, luego se midió el pH directamente en la suspensión. Estas mediciones proporcionaron datos precisos y en tiempo real para establecer una relación entre la temperatura, el pH del suelo y los posibles géneros bacterianos presentes. Según Reth et al. (2005), la toma de estos parámetros ( $T^{\circ}$  y pH) es esencial pa-

ra comprender los mecanismos que regulan las interacciones entre el suelo, las bacterias y los procesos biogeoquímicos.

### **Material de medios de cultivo**

La siembra de la muestra de intestino de los escarabajos se realizó a partir de la quinta dilución, esta consistió en colocar dentro de las cajas Petri con medio de cultivo 0,01 ml de cada una de estas diluciones mediante la técnica de agotamiento en estrías (Reynoso et al., 2015). Para la obtención de cultivos mixtos se trabajó con dos medios básicos de cultivo: Agar nutritivo (AN) que permite el crecimiento de la mayoría de bacterias y Agar Tripticosa de soja (TSA) que favorece el desarrollo de bacterias más exigentes en sus requerimientos nutricionales. Las placas respectivamente etiquetadas fueron puestas en la incubadora durante 48 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Salazar et al., 2009; Vasanthakumar et al., 2008). Además, se contó con dos repeticiones por cada dilución sembrada y con dos controles generales: un positivo que contenía muestra directa del intestino y un negativo solamente con medio de cultivo. Los cultivos fueron revisados cada 24 h.

Las colonias bacterianas presentes en los cultivos mixtos fueron diferenciadas de acuerdo a sus características macroscópicas y se aislaron de manera independiente sembradas nuevamente en TSA y AN y puestas en incubación durante 24 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  para adquirir cultivos puros.

El aislamiento de la muestra de suelo de los tres estados de sucesión se inició a partir de la dilución  $10^{-2}$ , y el procedimiento de siembra fue el mismo que se empleó para las muestras del intestino de los escarabajos hasta conseguir los aislados puros.

### **Identificación morfológica de cepas bacterianas**

De acuerdo a la caracterización macroscópica de las colonias puras y a la observación microscópica de las células bacterianas se realizó la revisión bibliográfica del manual de Bergey (Garrity & Holt, 2001) para lograr asociar los diferentes consorcios bacterianos con posibles géneros.

## **RESULTADOS**

### **Muestreo de escarabajos peloteros y suelo de los tres estados de sucesión ecológica**

Todos los especímenes capturados pertenecieron al género *Ontherus*, que en su mayoría están representados por la especie *Ontherus howdeni* Génier con un total de cinco ejemplares y existe un solo individuo de la especie *Ontherus hadros* Génier (Tabla 1).

**Tabla 1:** Especies de escarabajos capturados en los tres estados de sucesión ecológica de la Reserva Natural Tapichalaca.

Número de identificación	Especie	Área de sucesión
0007541	<i>Ontherus howdeni</i>	Bosque Natural
0007542	<i>Ontherus hadros</i>	Bosque Natural
0007543	<i>Ontherus howdeni</i>	Bosque Restaurado
0007544	<i>Ontherus howdeni</i>	Bosque Restaurado
0007545	<i>Ontherus howdeni</i>	Pastizal en Restauración
0007546	<i>Ontherus howdeni</i>	Pastizal en Restauración

En la Tabla 2 se pueden observar los datos de los paráme-

tros ambientales tomados in situ en tres sitios diferentes de la Reserva Natural Tapichalaca para este estudio. Se registraron temperaturas en rangos dentro de los 20 °C – 23 °C para los tres sitios de muestreo y tanto Bosque Natural como Bosque Restaurado se encuentran en un rango de pH neutro a diferencia del Pastizal en Restauración que es ligeramente ácido.

**Tabla 2:** Temperatura y pH de las muestras de suelo de los tres estados de sucesión ecológica de la Reserva Natural Tapichalaca.

Área de sucesión	Temperatura	pH	Elevación
Bosque Natural	22 °C	6,99	2503 m.s.n.m
Bosque Restaurado	21,8 °C	6,53	2450 m.s.n.m
Pastizal en Restauración	21,7 °C	5,70	2390 m.s.n.m

### *Aislamiento de bacterias a partir de intestinos de escarabajos peloteros y del suelo de los tres estados de sucesión ecológica*

En el espécimen 0007541 del Bosque Primario se aislaron ocho cultivos mixtos y 12 cultivos puros. En el segundo ejemplar 0007542 se obtuvieron seis cultivos mixtos y un total de 11 cultivos. En total se logró recuperar 23 cultivos puros entre los dos ejemplares del Bosque Primario.

Como resultado total de las dos muestras intestinales de los escarabajos del Bosque Primario, se identificaron 23 colonias puras. En el aislamiento bacteriano con la muestra intestinal del espécimen 0007543 de Bosque Restaurado existió crecimiento de cinco cultivos mixtos y se seleccionaron seis colonias puras. A partir de la muestra de intestino del escarabajo 0007544 presentó como resultado ocho cultivos mixtos y la selección de nueve colonias puras.

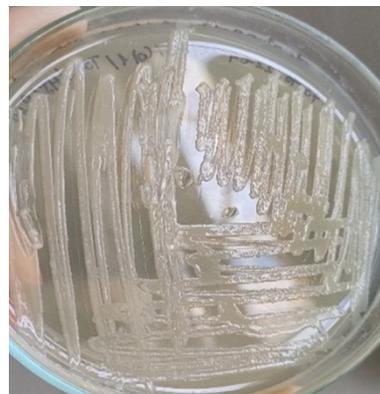
En total, el aislamiento bacteriano de las muestras de intestino de los dos escarabajos del Bosque Restaurado sumó 14 colonias puras. En la Figura 1 se puede observar el crecimiento de uno de los cultivos puros del escarabajo 0007543 perteneciente al Bosque Restaurado.



**Fig. 1:** Aislamiento de colonias puras de la muestra intestinal del escarabajo 0007543 perteneciente al Bosque Restaurado de la Reserva Natural Tapichalaca.

El aislamiento de la muestra del espécimen 0007545 dio como resultado el crecimiento de ocho cultivos mixtos y la selección de nueve colonias puras. Finalmente, con la muestra de intestino del escarabajo 0007546 se consiguieron siete cultivos mixtos y se identificaron diez colonias puras.

Las dos muestras de intestino de los escarabajos provenientes del Pastizal en Restauración suman en conjunto un total de 20 colonias puras. En la Figura 2 se puede observar el crecimiento de uno de los cultivos puros del escarabajo 0007546 perteneciente al Pastizal en Restauración.



**Fig. 2:** Aislamiento de consorcios bacterianos de la muestra intestinal del escarabajo 0007546 perteneciente al Pastizal en Restauración de la Reserva Natural Tapichalaca.

En el aislamiento bacteriano efectuado con las tres muestras de suelo de la Reserva Natural Tapichalaca, se evidenció el crecimiento de nueve cultivos mixtos y la selección de 11 colonias puras para el Bosque Primario. La muestra del Bosque Restaurado dio como resultado un total de siete cultivos mixtos, a partir de los cuales se seleccionaron 11 colonias puras. Finalmente, el crecimiento de bacterias a partir del suelo del Pastizal en Restauración presentó nueve cultivos mixtos y la identificación de 14 colonias puras.

En la figura 3 se ha colocado un ejemplo de dos cultivos puros del Pastizal en Restauración.



**Fig. 3:** Aislamiento de consorcios bacterianos de la muestra de suelo del Pastizal en Restauración de la Reserva Natural Tapichalaca.

### *Identificación morfológica de bacterias presentes en el intestino de los escarabajos y en las muestras de suelo*

Con base en las características macroscópicas de las colonias y en la identificación morfológica de las células bacterianas provenientes de la muestra de intestino del escarabajo 0007541 del Bosque Primario, se evidenciaron siete morfologías coloniales diferentes. Dentro de estos tipos existieron dos morfologías coloniales con mayor presencia, la primera con una forma irregular, borde lobulado, elevada, superficie opaca, seca y lisa, color crema blanquecino, no transparente,

siendo bacilos Gram+. La segunda morfología más repetida era de forma irregular, borde lobulado, elevada, superficie brillante, cremosa y rugosa, color crema oscuro, no transparente, tratándose de cocos Gram+. En el caso de la muestra intestinal del escarabajo 0007542 la morfología más repetida poseía una forma irregular, borde rizado, elevada, superficie brillante, viscosa y lisa, color crema blanquecino, translúcida, en la cual se observaron cocos Gram+.

En los especímenes del Bosque Primario se identificaron cinco morfologías coloniales en el caso de la muestra de intestino del escarabajo 0007543, de las cuales la morfología con características de forma irregular, borde ondulado, elevada, superficie opaca, seca y rugosa color crema blanquecino, no transparente y morfología celular correspondiente a bacilos Gram+, se repitió en más de una caja. Por otro lado, a partir de la muestra intestinal del espécimen 0007544, se obtuvieron cuatro morfologías coloniales, dos de estas fueron observadas en más de una colonia; tal es el caso de las colonias que presentaron una forma irregular, borde ondulado, elevada, superficie brillante, viscosa y lisa, color crema, no transparente y en el proceso de tinción se identificaron cocos Gram-. Asimismo, algunas siembras presentaron una morfología de forma irregular, borde ondulado, superficie elevada, brillante, cremosa, lisa, color crema no transparente y se identificaron como cocos Gram+.

En lo que respecta a los especímenes muestreados en el área de Pastizal en Restauración, se identificaron cinco morfologías coloniales diferentes para la muestra intestinal del escarabajo 0007545, la morfología más repetida presentó forma irregular, borde rizado, elevada, superficie brillante, viscosa y lisa, color blanco, no transparente, y se observaron con forma de cocos Gram-. En el caso de la muestra 0007546 se pudo apreciar cinco morfologías coloniales, dentro de las cuales existió una morfología con forma irregular, borde rizado, elevada, superficie brillante, viscosa y rugosa, color crema, no transparente que se trataba de cocos Gram-, la cual fue una de las más repetidas junto con la morfología colonial de características de forma irregular, borde rizado, superficie elevada, brillante, observados como cocos Gram+.

En la tabla 3 se detalla el número de morfologías encontradas para la muestra intestinal de cada escarabajo según el estado de sucesión del que provienen, asimismo, se presenta el número de casos de las diferentes morfologías celulares observadas. De acuerdo a la caracterización macroscópica

**Tabla 3:** Número de morfologías coloniales y celulares observadas en las muestras de intestino de los escarabajos colectados en distintos estados de sucesión de la Reserva Natural Tapichalaca.

	Bosque Primario		Bosque Restaurado		Pastizal en Restauración	
	7541	7542	7543	7544	7545	7546
Nro. Morfología colonial	7	6	5	4	5	5
Bacilos Gram+	5	3	3	1	1	1
Bacilos Gram-	0	1	1	0	3	1
Cocos Gram+	3	5	1	3	0	3
Cocos Gram-	4	2	1	5	5	5

ca de las colonias puras y a la observación microscópica de las células bacterianas se logró asociar a diferentes posibles géneros. Se identificaron cinco posibles géneros bacterianos: *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Staphy-*

*lococcus*. El género *Clostridium* se identificó en los cultivos puros del intestino del espécimen 0007541 del Bosque Primario; *Pseudomonas* y *Staphylococcus* se asignaron para las colonias bacterianas de la muestra intestinal del espécimen 0007542 del Bosque Primario; *Enterobacter* fue identificado en la muestra de intestino del escarabajo 0007546 del Pastizal en Restauración; en el caso del género *Bacillus* se encontró al menos en una de las dos muestras de intestino de los especímenes del Bosque Primario y del Bosque Restaurado, y en ambas muestras de los escarabajos provenientes del Pastizal en Restauración (Tabla 4).

**Tabla 4:** Posibles géneros bacterianos identificados en las muestras de intestino de los escarabajos que habitan en los tres estados de sucesión de la Reserva Natural Tapichalaca.

Género	Estado de sucesión					
	Bosque Primario		Bosque Restaurado		Pastizal en Restauración	
	7541	7542	7543	7544	7645	7546
<i>Clostridium</i>	X					
<i>Pseudomonas</i>		X				
<i>Bacillus</i>		X	X		X	X
<i>Enterobacter</i>						X
<i>Staphylococcus</i>		X				

En la identificación morfológica de colonias y células bacterianas obtenidas en el aislamiento de las muestras de suelo, se encontraron nueve morfologías coloniales para el Bosque Primario, en donde aquella que más se repetía presentó características de forma irregular, su elevación elevada, color crema, no transparencia de luz y la superficie cremosa, tratándose de bacilos Gram+. En la caracterización de las colonias bacterianas de la muestra del Bosque Restaurado se identificaron seis tipos de morfología colonial; el tipo de colonia con más observaciones poseía forma irregular, borde ondulado, superficie cremosa y brillante, y color crema, y se visualizó con forma de cocos Gram+. En cambio, para la muestra del Pastizal en Restauración se distinguieron nueve morfologías coloniales; la morfología de forma irregular, borde ondulado, elevación elevada, superficie mate, cremosa y rugosa, color crema opaco, no transparente estuvo presente en mayor cantidad de siembras, en donde se identificaron cocos Gram+. En la Tabla 5 se presenta un resumen de la cantidad de morfologías coloniales identificadas a partir del aislamiento de la muestra de suelo de cada estado de sucesión ecológica, detallando también el número de ocasiones en las que se identificaron las diferentes morfologías celulares y el tipo de Gram.

**Tabla 5:** Morfologías coloniales y celulares observadas en las muestras de suelo de los tres niveles de sucesión de la Reserva Natural Tapichalaca.

Nro. Morfología colonial	Bosque Primario	Bosque Restaurado	Pastizal en Restauración
		9	6
Bacilos Gram+	4	3	4
Bacilos Gram-	1	0	1
Cocos Gram+	3	6	6
Cocos Gram-	3	2	3

Como resultado de la diferenciación de características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas encon-

tradas en las muestras de suelo y con base en la revisión bibliográfica realizada, fueron asociadas a cuatro posibles géneros bacterianos: *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. El género *Corynebacterium* se encontró únicamente en la muestra de suelo del Bosque Primario y *Pseudomonas* en la muestra de suelo del Pastizal en Restauración; *Clostridium* y *Bacillus* estaban presentes tanto en la muestra de suelo del Bosque Primario como en las muestras del Bosque Restaurado y del pastizal (Tabla 6).

**Tabla 6:** Posibles géneros bacterianos identificados en las muestras de suelo de los tres estados de sucesión de la Reserva Natural Tapichalaca.

Género	Estado de sucesión		
	Bosque Primario	Bosque Restaurado	Pastizal en Restauración
<i>Corynebacterium</i>	X		
<i>Clostridium</i>	X	X	X
<i>Pseudomonas</i>			X
<i>Bacillus</i>	X	X	X

## DISCUSIÓN

Varios autores como Rhoads *et al.* (2012) han discutido la importancia de utilizar métodos de identificación dependientes de cultivo para caracterizar organismos, pero también han enfatizado la necesidad de complementar estos enfoques con técnicas de identificación molecular para lograr una mayor precisión y comprensión de la especie en cuestión. Si bien los métodos dependientes de cultivo, como la observación de características morfológicas y el crecimiento en medios específicos, pueden proporcionar información inicial valiosa, existen limitaciones en términos de identificar especies con alta precisión. En este sentido, los enfoques moleculares, como la secuenciación de ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten la amplificación y análisis directo del material genético, proporcionando información más precisa y confiable para identificar y clasificar organismos hasta el nivel de especie.

La identificación de bacterias presentes en el intestino de los escarabajos permitió reconocer cinco posibles géneros bacterianos como: *Clostridium* que estuvo presente únicamente en el intestino del espécimen 7541 del Bosque Primario, esta particularidad acerca de su presencia puede deberse que este género del orden Clostridial no suele ser muy abundante en escarabajos comedores de estiércol (Ebert *et al.*, 2021). Otra razón que explique la existencia de estas bacterias en la microbiota intestinal de los escarabajos es que generalmente se encuentran relacionadas a ciertos factores como la compartimentación del intestino o las diferentes etapas de su desarrollo, encontrándose más presentes en nuevos adultos (Briones-Roblero *et al.*, 2017; Chouaia *et al.*, 2019). El género *Pseudomonas* se encontró únicamente en la muestra intestinal del escarabajo 0007542 del Bosque Primario. Las *Pseudomonas* están frecuentemente asociadas a diversas etapas de la vida de los insectos, y les aseguran un conjunto de funciones fisiológicas, por ejemplo, la degradación de polisacáridos, lípidos y de la celulosa, asignación de nutrientes, fijación de nitrógeno y reciclaje de compuestos nitrogenados. Se han registrado individuos del género mencionado en especies de escarabajo como el *Holotrichia parallelea* (Coleop-

tera: Scarabaeidae) (Estes *et al.*, 2013). Huang *et al.* (2012) con base en los resultados de su investigación con muestras de larvas, afirman que *Pseudomonas* fue el grupo más dominante de bacterias celulolíticas en el intestino de las larvas de escarabajos que habitan en el suelo. No obstante, en el presente estudio los resultados no fueron similares, lo que posiblemente pueda estar justificado por el método de aislamiento. El género *Staphylococcus* también se encontró en la muestra del escarabajo 0007542, la existencia y la capacidad de estas bacterias en el microbioma de los escarabajos para producir compuestos antimicrobianos y desarrollarse en sustratos ricos en lípidos y proteínas, incluidos los productos cárnicos, les permiten aportar la regulación de la carroña (Shukla *et al.*, 2018).

El único género bacteriano que se identificó en al menos una muestra de intestino de escarabajo de cada estado de sucesión fue *Bacillus*, las bacterias de este género son cosmopolitas relacionadas con el tracto digestivo de animales e insectos, por lo tanto, juegan un papel extremadamente diverso en organismos vertebrados e invertebrados. Además, es posible que estos microorganismos se adquieran del medio ambiente dado su cosmopolitismo y posiblemente sean microbios intestinales transitorios que pasan por el intestino con la alimentación (Shelomi & Chen, 2020).

Por otro lado, el género *Enterobacter* se logró identificar en una muestra de intestino de escarabajo del pastizal, las Enterobacteriaceae se asocian con frecuencia con funciones nutricionales en insectos. Diferentes especies de *Enterobacter* tienen una diversidad de capacidades funcionales en los intestinos de los insectos al ayudar en su nutrición (Estes *et al.*, 2013). Sin embargo, la estructura comunitaria de esta familia está relacionada con cambios evolutivos en la ecología de los escarabajos, como el hábito alimentario, el hábitat y la morfología intestinal (Kudo *et al.*, 2019).

En el aislamiento de cepas bacterianas con las muestras de suelo, se registró la existencia de *Corynebacterium* en la muestra de suelo del Bosque Primario, la presencia de este género bacteriano puede manifestarse debido a la gran cantidad de vegetación que existe en el Bosque Primario, ya que es uno de aquellos géneros que prosperan en suelos vírgenes cumpliendo con la función de solubilizadoras de fosfato, lo que aumenta el crecimiento de las plantas por varios mecanismos directos e indirectos (Kaur & Kaur, 2020). Sin embargo, en varios estudios también se indica que estas bacterias generalmente se encuentran en suelos contaminados por petróleo, lo que puede atribuirse al hecho de que estos suelos a menudo albergan una gran variedad de flora microbiana que es capaz de utilizar los hidrocarburos como fuente de energía y carbono, debido al aumento de suministro de carbono que generan los hidrocarburos residuales en el suelo, favoreciendo así el crecimiento de estos organismos competentes en la degradación de contaminantes hidrocarbúrferos (Nwinyi & Akinmulewo, 2019; Ozoude *et al.*, 2018).

El género *Pseudomonas* se identificó solamente en la muestra del pastizal, estas bacterias logran desarrollarse en cualquier entorno dentro de un rango de pH de 4 a 8 (Li *et al.*, 2018), rango que coincide con el que posee esta área de sucesión. Puede decirse también que al tratarse de un suelo en recuperación y que aún presenta rasgos de degradación por ganadería, la presencia de *Pseudomonas* es posible ya que en algunos estudios se ha comprobado que pueden ser predomi-

nantes en suelos de baja calidad (Bollinger et al., 2020).

Los géneros *Clostridium* y *Bacillus* se reconocieron en los cultivos puros obtenidos de las muestras de suelo de los tres estados de sucesión (Bosque Primario, Bosque Restaurado y Pastizal en Restauración). Las bacterias *Clostridium* ciertamente se encuentran en diversos ambientes (Shin et al., 2018), se han estudiado en sitios de bosques primarios de tierras altas que no han sufrido alteraciones y en sitios de bosques secundarios de tierras altas que tenían apariencia similar a los bosques primarios, pero han sufrido alteraciones o han sido pastoreados durante años, luego abandonados y en proceso de regeneración natural, en donde se ha observado que incluso su presencia puede ser mayor en los bosques secundarios que en los primarios (Eaton et al., 2020). Las bacterias del género *Clostridium* también se han aislado de muestras de suelos que han sido labrados y de suelos de pastizales anteriormente dedicados a la ganadería y se ha evidenciado que su presencia es abundante, no obstante, esta puede ser mayor en presencia de ganadería ya que se piensa que estas bacterias están estrechamente relacionadas con el estiércol (Ding et al., 2014; Larina et al., 2020).

Los miembros del género *Bacillus* casi siempre se encuentran en la rizósfera de diversos ambientes, incluyendo bosques y suelos desérticos (Dong et al., 2019; Zheng et al., 2020). Tanto en el Bosque Primario como en el Bosque Restaurado, la notable presencia de vegetación puede ser gracias a que estos microorganismos endófitos ayudan a la descomposición de la materia orgánica y mejoran la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de la mayoría de plantas (Hu et al., 2021). En ocasiones el cambio de uso de suelo no suele afectar la presencia de estas bacterias, por ello se ha encontrado que pueden ser abundantes en los pastizales, aunque en algunos estudios se menciona que cuando las tierras que han sido trabajadas regresan a los ecosistemas naturales, los nutrientes del suelo inicialmente disminuyen rápidamente debido al cese de la fertilización, lo que puede influir notablemente en la diversidad microbiana del suelo (Guo et al., 2018; Xu et al., 2021). No obstante, en este estudio no se concuerda con esta idea, a razón de que las muestras del pastizal permitieron relacionar las colonias puras con una mayor cantidad de géneros bacterianos en comparación a las muestras del Bosque Restaurado.

En cuanto a las condiciones del suelo, en el muestreo de suelo se logró evidenciar que el pH varía de acuerdo al estado sucesional, los resultados arrojaron valores prácticamente neutros de 6,99 para el suelo del Bosque Natural, 6,53 para el Bosque Restaurado y un valor de valor de 5,70 para el Pastizal en Restauración, considerándose este último el valor con mayor cambio y acidez. A futuro se deberán hacer estudios sobre la incidencia de las condiciones físicas y químicas del suelo de bosques naturales e intervenidos sobre las comunidades de bacterias.

## CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvo un total de 32 aislados puros provenientes del intestino de los escarabajos colectados. El género de escarabajos predominante en la colecta fue el género *Ontherus* (*O. hadros* y *O. howdeni*). De estos 32 aislados se identificaron mediante morfología colonial y celular cinco posibles géneros bacterianos donde el género *Bacillus*

fue identificado en cuatro de los seis especímenes.

A partir de las muestras de suelo se logró obtener 24 aislados puros provenientes de Bosque Primario, Bosque Restaurado y Pastizal en Restauración, en estas muestras los posibles géneros identificados en los tres estados de sucesión fueron *Clostridium* y *Bacillus* que concuerda con los parámetros de T° y pH analizados ya que estos géneros son conocidos por desarrollarse en rangos neutros de pH y en rangos de T° de 20 °C – 40 °C.

Los 56 aislados bacterianos de la Reserva Tapichalaca han sido preservados y se encuentran almacenados a una temperatura de -80°C, para garantizar la viabilidad y estabilidad a largo plazo. Esta colección de aislados bacterianos representa una valiosa reserva de recursos microbiológicos que permitirá investigaciones futuras sobre la diversidad y el rol de estos organismos en procesos de restauración del suelo

Esta investigación demuestra que el aislamiento de bacterias mediante métodos dependientes de cultivo e identificación morfológica sigue siendo válido y viable para la determinación de géneros bacterianos. Estos enfoques clásicos de cultivo en medios básicos y el análisis de características morfológicas permiten obtener aislados puros de bacterias, lo que facilita su posterior identificación y caracterización, sin embargo a efectos de profundizar la identificación bacteriana a nivel de especie es pertinente destacar la necesidad de realizar análisis moleculares que permitirán conocer con claridad especies presentes en el intestino de los escarabajos así como del suelo de distintos estados de sucesión.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Fundación Jocotoco que, a través de José León (Coordinador de Investigación) y de los guardaparques Franco Mendoza y Ramiro Mendoza de la Reserva Tapichalaca, nos otorgaron el acceso a la reserva y nos apoyaron durante la investigación

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a Joselyn Jiménez y Soraya Salazar por su invaluable contribución en la realización de nuestro estudio y, especialmente, por su destacada labor en la parte de la metodología y la ejecución de la parte práctica. Agradecemos también a Fausto Paladines (Museo LOUNAZ) por su aporte sobre los escarabajos peloteros de Tapichalaca que complementa este estudio y por su ayuda en el trabajo de campo.

Extendemos nuestra gratitud a Silvia Altoé Falqueto (Universidad Federal de Mato Grosso, Brasil), por compartir su experticia en el cultivo de bacterias asociadas a larvas de escarabajos fitófagos, su conocimiento, apoyo y calidez aportó significativamente en el inicio de esta investigación. Un agradecimiento a Fernando Vaz-de-Mello (Universidad Federal de Mato Grosso, Brasil), por su apoyo con las identificaciones de los escarabajos peloteros a nivel de especie.

También agradecemos a Yadira Collahuazo, Melania Uchuari y María del Cisne Gonzales, por su apoyo y orientación en la preparación de medios de cultivo, así como en el manejo de los equipos de laboratorio empleados.

Este estudio se llevó a cabo bajo el permiso de investigación del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica número MAAE-ARSFC-2021-1713.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización: APC y DRC; metodología: APC, DRC, HJG; análisis formal: DRC; investigación: APC, DRC, HJG; recursos: APC, DRC, HJG; curación de datos: DRC; redacción — preparación del borrador original: DRC; redacción — revisión y edición: APC y DRC; visualización: APC y DRC; supervisión: APC y DRC; administración de proyecto: APC y DRC; adquisición de financiamiento para la investigación: APC y DRC. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Aura Paucar-Cabrera: APC. Daniela Román-Cáceres: DRC. Heidy Jimenez-Granda: HJG.

## FINANCIAMIENTO

Este estudio se llevó a cabo con financiamiento propio y de la Universidad Nacional de Loja, con el proyecto 07-DI-FARNR-2021 titulado “Uso de escarabajos biorecicladores (Coleoptera: Scarabaeinae) y consorcios bacterianos del suelo como estrategia para la regeneración de ecosistemas en tres áreas de Loja y Zamora Chinchipe”, otorgado por la Dirección de Investigación a Aura Paucar Cabrera (IP) y al grupo de investigación del Museo de Zoología LOUNAZ-UNL.

## REFERENCIAS

- Arias-Cordero, E., Ping, L., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M., & Boland, W. (2012). Comparative Evaluation of the Gut Microbiota Associated with the Below- and Above-Ground Life Stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS ONE*, 7(12).
- Bollinger, A., Thies, S., Katzke, N., & Jaeger, K. (2020). The biotechnological potential of marine bacteria in the novel lineage of *Pseudomonas pertucinogena*. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 19–31.
- Briones-Roblero, C. I., Hernández-García, J. A., Gonzalez-Escobedo, R., Soto-Robles, L. V., Rivera-Orduña, F. N., & Zúñiga, G. (2017). Structure and dynamics of the gut bacterial microbiota of the bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) across their life stages. *PLOS ONE*, 12(4), e0175470.
- Castañeda Briones, M. T. (2003). (PDF) *Microbiología Aplicada: Manual de Laboratorio*, Castañeda Briones, María Teresa - DOKUMEN.TIPS.
- Chamorro, W., Marín-Armijos, D., Granda, V., & Vaz-De-Mello, F. Z. (2018). Checklist with a key to genera and subgenera of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) present and supposed for Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*, 44(1), 72–100.
- Chouaia, B., Goda, N., Mazza, G., Alali, S., Florian, F., Giunchetti, F., Callegari, M., Gonella, E., Magoga, G., Fusi, M., Crotti, E., Daffonchio, D., Alma, A., Paoli, F., Roversi, P. F., Marianelli, L., & Montagna, M. (2019). Developmental stages and gut microenvironments influence gut microbiota dynamics in the invasive beetle *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environmental Microbiology*, 21(11), 4343–4359.
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. (2007). Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2).
- Da Silva, P. G., & Hernández, M. I. M. (2015). Spatial patterns of movement of dung beetle species in a tropical forest suggest a new trap spacing for dung beetle biodiversity studies. *PLoS ONE*, 10(5), 1–18.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7.
- Ding, G. C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., & Schloter, M. (2014). Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS ONE*, 9(3).
- Dong, X., Lv, L., Wang, W., Liu, Y., Yin, C., Xu, Q., Yan, H., Fu, J., & Liu, X. (2019). Differences in distribution of potassium-solubilizing bacteria in forest and plantation soils in myanmar. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(5), 1–14.
- Eaton, W. D., McGee, K. M., Hoke, E., Lemenze, A., & Hajibabaei, M. (2020). Influence of Two Important Leguminous Trees on Their Soil Microbiomes and Nitrogen Cycle Activities in a Primary and Recovering Secondary Forest in the Northern Zone of Costa Rica. *Soil Systems*, 4(4), 65.
- Ebert, K. M., Arnold, W. G., Ebert, P. R., & Merritt, D. J. (2021). Hindgut Microbiota Reflects Different Digestive Strategies in Dung Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), 1–17.
- Estes, A. M., Hearn, D. J., Snell-Rood, E. C., Feindler, M., Feeser, K., Abebe, T., Dunning Hotopp, J. C., & Moczek, A. P. (2013). Brood Ball-Mediated Transmission of the Microbiome Members in the Dung Beetle, *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, 8(11), e79061.
- Falqueto, S. A., de Sousa, J. R., da Silva, R. C., da Silva, G. F., Pinheiro, D. G., & Soares, M. A. (2022). Larval gut microbiome of *Pelidnota luridipes* (Coleoptera: Scarabaeidae): high bacterial diversity, different metabolic profiles on gut chambers and species with probiotic potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(11).
- Fundación Jocotoco. (2022). *Sobre la Reserva Tapichalaca*.
- Garrity, G. M., & Holt, J. G. (2001). The Road Map to the Manual. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*.
- Gu, Y., Bai, Y., Xiang, Q., Yu, X., Zhao, K., Zhang, X., Li, C., Liu, S., & Chen, Q. (2018). Degradation shaped bacterial and archaeal communities with predictable taxa and their association patterns in Zoige wetland at Tibet plateau. *Scientific Reports*, 8(1), 3884.
- Guo, Y., Chen, X., Wu, Y., Zhang, L., Cheng, J., Wei, G., & Lin, Y. (2018). Natural revegetation of a semiarid habitat alters taxonomic and functional diversity of soil microbial communities. *Science of The Total Environment*, 635, 598–606.
- Heylen, K., Hoefman, S., Vekeman, B., Peiren, J., & De Vos, P. (2012). Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. In *Applied Microbiology and*

Biotechnology (Vol. 94, Issue 3).

- Hu, H., Ye, R., Pang, L., Jiang, H., Tian, K., Gao, Y., Ji, Y., Wan, P., Yang, J., Zou, X., & Tian, X. (2021). After Life Effect of Endophytic Bacterium *Bacillus Cereus* on Litter Decomposition. Research Square.
- Huang, S., Sheng, P., & Zhang, H. (2012). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 2563–2577.
- Kaur, R., & Kaur, S. (2020). Variation in the Phosphate Solubilizing Bacteria from Virgin and the Agricultural Soils of Punjab. *Current Microbiology*, 77(9), 2118–2127.
- Kudo, R., Masuya, H., Endoh, R., Kikuchi, T., & Ikeda, H. (2019). Gut bacterial and fungal communities in ground-dwelling beetles are associated with host food habit and habitat. *The ISME Journal*, 13(3), 676–685.
- Larina, G. E., Seraya, L. G., Ivanova, I. O., Poddymkina, L. M., & Vershinin, V. V. (2020). Microbial complex adaptation in soils of different cultivation degrees. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 579(1).
- Li, J., Yu, H., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., Qiu, G., Zeng, W., & Yu, R. (2018). Novel Hyper Antimony-Oxidizing Bacteria Isolated from Contaminated Mine Soils in China. *Geomicrobiology Journal*, 35(8), 713–720.
- Losey, J. E., & Vaughan, M. (2006). The economic value of ecological services provided by insects. In *BioScience* (Vol. 56, Issue 4).
- Nwinyi, O. C., & Akinmulewo, B. A. (2019). Remediation of soil polluted with spent oil using cow dung. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 331(1), 012058.
- Ortiz-Álvarez, R., Fierer, N., de los Ríos, A., Casamayor, E. O., & Barberán, A. (2018). Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *The ISME Journal*, 12(7), 1658–1667.
- Ozoude, T., Eleanya, E., Uzoaru, N., & Okey-Ndeche, N. (2018). Isolation and Characterization of Some Hydrocarbon Utilizing Bacteria Isolated from Contaminated Soil in Zuma, Bwari Area Council, Fct, Abuja, Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 22(6), 1–8.
- Reth, S., Reichstein, M., & Falge, E. (2005). The effect of soil water content, soil temperature, soil pH-value and the root mass on soil CO<sub>2</sub> efflux - A modified model. *Plant and Soil*, 268(1).
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general* (Primera edición). Unirío.
- Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Sun, Y., & Dowd, S. E. (2012). Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3).
- Salazar, J. D. G., Quiñones, R., & Jiménez, P. (2009). Aislamiento de Microorganismos del Tracto Digestivo de Larvas de Coleópteros y Lepidópteros Detritívoros y Evaluación, In Vitro, de su Efecto Antagónico en una Cepa de *Fusarium oxysporum*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1–2), 106–113.
- Sansupa, C., Purahong, W., Wubet, T., Tiansawat, P., Pathom-Aree, W., Teaumroong, N., Chantawannakul, P., Buscot, F., Elliott, S., & Disayathanoowat, T. (2021). Soil bacterial communities and their associated functions for forest restoration on a limestone mine in northern Thailand. *PLOS ONE*, 16(4), e0248806.
- Schloss, P. D., Delalibera, I., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 35(3).
- Shelomi, M., & Chen, M.-J. (2020). Culturing-Enriched Metabarcoding Analysis of the *Oryctes rhinoceros* Gut Microbiome. *Insects*, 11(11), 782.
- Shin, Y., Paek, J., Son, A. Y., Kim, H., Kook, J.-K., Paek, W. K., & Chang, Y. H. (2018). *Clostridium composti* sp. nov., a new anaerobic bacteria isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(12), 3869–3873.
- Shukla, S. P., Plata, C., Reichelt, M., Steiger, S., Heckel, D. G., Kaltenpoth, M., Vilcinskas, A., & Vogel, H. (2018). Microbiome-assisted carrion preservation aids larval development in a burying beetle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(44), 11274–11279.
- Vasanthakumar, A., Handelsman, J. O., Schloss, P. D., Bauer, L. S., & Raffa, K. F. (2008). Gut microbiota of an invasive Subcortical Beetle, *Agrilus planipennis* fairmaire, across various life stages. *Environmental Entomology*, 37(5).
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 40).
- Xu, A., Liu, J., Guo, Z., Wang, C., Pan, K., Zhang, F., & Pan, X. (2021). Soil microbial community composition but not diversity is affected by land-use types in the agro-pastoral ecotone undergoing frequent conversions between cropland and grassland. *Geoderma*, 401(April), 115165.
- Yu, Q., Hanif, A., Rao, X., He, J., Sun, D., Liu, S., He, D., & Shen, W. (2021). Long-term restoration altered edaphic properties and soil microbial communities in forests: evidence from four plantations of southern China. *Restoration Ecology*, 29(4), 1–11.
- Zheng, X., Liu, G., Wang, Z., Wang, J., Zhang, H., & Liu, B. (2020). *Bacillus dafuensis* sp. Nov., Isolated from a Forest Soil in China. *Current Microbiology*, 77(9), 2049–2055.