

아메리카동애등에 장내세균 동정과 생리적 특징

김은성 · 박지영 · 이상훈¹ · 김용균*
안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과, ¹(주) 그린테코

Identification and Physiological Characters of Intestinal Bacteria of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*

Eunsung Kim, Jiyeong Park, Sanghoon Lee¹ and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea
¹GreenTeko, Inc., Suwon 440-849, Korea

ABSTRACT: The black soldier fly, *Hermetia illucens*, larvae may depend on indigenous bacteria in the intestine to feed and digest diverse food sources. To prove this hypothesis, we isolated and identified the intestinal bacteria of the black soldier fly for their digestive and antimicrobial abilities. The last instar larvae had long digestive tracts, which were about seven times longer than its body length. An individual of *H. illucens* larvae possessed a total of 5.0×10^6 bacteria in the whole intestine, of which more than 98% bacteria were located in the hindgut. Three different bacterial isolates cultured on nutrient agar (NA) medium were detected in the intestine and identified as *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* and *Bacillus halodurans* by Biolog microbial identification system. Analysis of 16S rDNA sequences of the intestinal bacteria detected the additional bacteria of *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, and *Providencia* sp. These intestinal bacteria cultured on NA medium exhibited high resistance to 4 antibiotics and inhibited growth of other microbes which are mainly plant pathogens. Also, these bacteria exhibited catalytic activities to degrade cellulose, lipid, proteins, and carbohydrates. These results suggest that *H. illucens* larvae possess intestinal bacteria that may play crucial roles in their digestive physiology.

Key words: Black soldier fly, Enterobacterium, Antimicrobial activity, Digestive enzyme, Symbiosis

조 록: 다양한 먹이 조건에서 생활하는 아메리카동애등에(*Hermetia illucens*)는 장내 세균의 의존성을 가질 수 있다. 이 가설을 증명하기 위해 본 연구는 종령 유충의 소화관에 존재하는 세균을 분리, 동정하고 효소활성 및 항균 능력을 분석하였다. 종령 유충의 소화관은 몸 체장에 약 7 배의 길이를 나타냈다. 한 개체의 소화관 내 존재하는 세균 수는 5.0×10^6 cfu로 98% 이상이 후장에 존재했다. 소화관에는 3 종류의 상이한 세균이 존재했고, 미생물 동정 장치는 이들이 각각 *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* 및 *Bacillus halodurans*로 동정하였다. 이들 소화관 세균을 16S rDNA 서열을 분석한 결과 이 외에 *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia* sp.를 검출하였다. 이들 장내세균은 항생제 내성을 보였고, 타미생물의 성장을 억제하였다. 또한 섬유소, 지질, 단백질 및 탄수화물의 분해 능력을 보유하고 있었다. 본 연구 결과들은 아메리카동애등에 소화관에 유용성이 높은 세균을 보유하고 있다고 제시하였다.

검색어: 아메리카동애등에, 장내세균, 항균력, 소화효소, 공생

아메리카동애등에(*Hermetia illucens*)는 파리목 동애등에과에 속하는 곤충으로 북아메리카 원산지이나 전 세계로 퍼져나가 온대지역 전역에 분포하는 범존종으로 분류된다(Sheppard et al., 2002). 유충은 잡식성으로 주로 인축의 음식물 폐기물에

서 발생하여 환경 정화 곤충으로 주목을 받아 왔다. 또한 이 유기 폐기물에서 다수의 유충이 함께 섭식하면서 고온(50-60°C)을 발생하고, 항생물질을 분비하여 타 생명체의 접근을 억제한다(Landi, 1960; Erickson et al., 2004; Choi et al., 2012). 즉, 다양한 항생물질을 생산하는 아메리카동애등에는 의약품 물질 생산 측면에서도 산업적 이용 가능성을 보이고 있다(Natori, 1995; Sherman et al., 2000). 다 자란 유충은 약 2 cm 크기가 되

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received July 17 2013; Revised September 24 2013

Accepted October 4 2013

고, 단백질(전체의 40% 이상) 및 지질(전체의 30% 이상)의 영양물질 구성이 좋아 가축에 양질의 사료로 사용되고 있다(Newton et al., 1997). 또한 높은 지질 함량은 바이오연료로서의 가능성도 제기되었다. 또한 동애등에의 배설물은 양질의 유기질 비료로 사용이 가능하게 된다(Diener et al., 2009).

음식물 쓰레기를 정화할 목적으로 산업적으로 응용되는 아메리카동애등에의 유용 기능은 이 곤충의 광식성에 기인한 것으로 이에 대한 연구의 일환으로 이들의 소화효소의 종류와 특성 및 장내 공생미생물 분석이 이뤄지고 있다. 이 곤충의 소화관 즙액은 비교적 높은 단백질, 탄수화물 및 지질 분해 능력을 소유하고 있는 것으로 밝혀졌다(Kim et al., 2011a,b). 또한 탄수화물 가운데에서도 섬유소 분해 능력을 보유하고 있어, 이들의 소화와 있어 공생 미생물의 의존이 높을 것으로 예견하였다. 아메리카동애등에의 장내 미생물을 메타게놈 방식으로 분석한 결과 6개 문의 세균류가 검출되었다(Jeon et al., 2011). 일반적으로 이러한 장내 미생물은 소화, 발육 및 면역에 중요한 역할을 담당할 뿐만 아니라 병원 미생물의 정착을 억제하는 데 요구된다(Qin et al., 2010; Roh et al., 2008; Yu et al., 2008). 그러나 장내 서식하는 미생물 가운데 기주와 단순히 편리공생이 아니라 상호 상생공생 관계를 이루는 미생물을 결정하는 것은 쉽지 않다. 예로서 아메리카동애등에의 경우도 장내 세균의 종류는 먹이 조건에 따라 상이하게 나타나며, 먹이의 다양성에 따라 세균의 종류도 다양하게 나타나는 경향을 보여서 공생관계를 이루는 미생물의 종류는 동적 변화를 이루고 있다는 것을 나타내고 있다(Jeon et al., 2011; Zheng et al., 2013).

국내 산업용으로 응용되고 있는 아메리카동애등에에 대해서 발현유전체를 분석하였다(Park et al., 2013). 면역, 스트레스 및 소화와 관련된 다수의 유전자를 동애등에 전사체에서 찾을 수 있었다. 특별히 이들 유전자의 발현과 동애등에의 발육은 관련성이 높은 것으로 나타나고 있다. 여기에 본 연구는 동애등에의 장내 서식하는 세균류를 분석하여 동애등에의 소화능력에 대한 이해를 넓히고자 수행되었다. 장내 세균의 동정은 소화관 즙액을 추출하고, 이를 16S rDNA 서열 기반 메타게놈 방식으로 진행하되 다시 동일한 소화관 추출액을 영양배지에 도말하여 상이한 균총을 얻고 이를 탄소원 이용원 차이에 기반을 둔 미생물동정장치로 동정하였다. 본 연구는 아메리카동애등에의 소화관에서 상이한 3 종의 세균을 보고하고 이들에 대해서 소화효소 활성 및 항생 능력을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

동애등에 사육

시험곤충은 공주시 정안면의 그린테크에서 얻은 유충을 분양받아 돼지사료(Nonghyup Livestock Grains, Seoul)를 먹이로 유충 성장을 유지시켰다.

동애등에 소화관 분리 및 장내 미생물 추출

동애등에 종령 유충을 선별하여 체장을 측정하였다. 이후 체표면을 70% 에탄올로 표면 살균한 후 멸균된 인산완충용액(PBS: 100 mM phosphate, 0.7% NaCl, pH 7.4)에서 소화관을 분리하였다. 소화관은 전체, 전장+중장 및 후장으로 나누어 길이를 측정하였다. 후장의 시작은 말피기관의 기부로 판정하였다.

각 부위의 소화관은 3 마리에서 분리하여 함께 200 μ l의 멸균수에 넣고 마쇄하였다. 이 마쇄액을 약 200 \times g에서 3 분간 원심분리후 상등액을 멸균수에 10 배 희석하여 100 μ l 씩 nutrient agar (NA: Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain)에 도말하여 30°C 조건의 혐기성 배양기(Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA)에서 24시간 배양하였다.

Biolog 미생물동정장치를 이용한 동애등에 장내 세균 동정

NA 배지에서 자란 균총들 가운데 형태가 상이한 3종류의 세균을 대상으로 Bensen (1990)의 방법으로 그람염색을 하였다. 그램 염색후 균의 종 동정을 위해 각각의 단일 균총의 균을 멸균된 면봉을 이용하여 현탁액을 만들어 탁도계(Biolog, Hayward, CA, USA)를 사용하여 농도를 측정하였으며, 그 농도는 그람 음성균인 I, II 균은 탁도의 범위가 50~60, 그람 양성균인 III 균은 탁도의 범위가 20~30 사이였다. 농도가 측정된 현탁액 중 그람 양성 균은 GP microplate, 그람 음성 균은 GN microplate 에 각각 접종하여 30°C에 20 시간 배양시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻어진 흡광도 자료는 MicroLog 4.2 software를 이용하여 종 동정에 이용되었다.

16S rDNA를 이용한 동애등에 장내 세균 동정

소화관 추출물의 원액을 NA 배지에 도말하여 얻은 세균 단일 균을 루프로 수거하여 게놈 DNA 추출에 사용하였다. DNA 추출은 Sambrook et al. (1989)의 게놈 DNA 추출법을 이용하였다. 16S rDNA 부위는 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

와 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)의 두 프라이머 (Yeom et al., 2012)를 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 35 회 증폭 주기로 실시되었으며, 각 주기는 94°C 변성, 55°C 재성 및 72°C 사슬연장의 반응 순서로 구성되었다. 증폭된 결과물은 PCR2.1 cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 TA 클로닝시킨 후 *Escherichia coli* Top10 균주세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 균총 가운데 임의로 20 개를 선발하여 바이오니아사(Daejon, Korea)의 제한효소인 *Alu* I과 *Msp* I으로 절편 다형을 보이는 균주를 선발하였다. 선발된 상이한 균주의 16S rDNA 염기서열은 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 DNA 서열을 분석하였다. 세균의 동정은 벡터 서열을 제거한 16S rDNA 서열로 정리한 후 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 BlastN 검색엔진의 유사도 분석을 통해 수행하였다.

동애등에 장내세균의 항생제 내성 분석

항생제 내성 분석은 Ji and Kim (2004)의 방법을 변형한 방법으로 장내세균증식 억제유무에 따라 결정하였다. 4 종류의 항생제(ampicillin, kanamycin, tetracycline, streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich, 미국내 도시 등)를 멸균수를 이용하여 각각 1, 10, 10², 10³, 10⁵, 10⁷ ppm 농도로 조제하여 직경 6 mm의 멸균한 원형 여과지에 20 µl 씩 분주하였다. 처리된 여과지를 동애등에 장내 세균(2 × 10⁶ cfu/plate)이 각각 도말된 NA 배지에 올린 후 48 시간 동안 28°C에서 배양한 후 여과지 주변의 세균 성장 억제 유무를 관찰하였다. 이때 항생제의 억제 능력을 판별하기 위한 대조 세균으로 *E. coli* 성장을 이용하였고, 이 세균의 성장은 37°C에서 동일한 방법으로 조사하였다. 각 처리 농도는 3 반복으로 실시하였다.

동애등에 장내세균의 항균력 분석

장내세균의 항균력은 Ji et al. (2004)의 방법을 변형하여 분석하였다. 우선 동애등에 세균(5 × 10⁸ cfu/mL)을 직경 6 mm의 멸균된 원형 여과지에 20 µl 씩 분주하고 28°C에서 48 시간동안 NA 배지 상에서 배양시켰다. 여과지에 자란 세균을 chloroform으로 1 시간 동안 혼증시켜 살균하여 이 세균이 분비한 항생물질의 항균력 효과만 분석하게 하였다. 억제 대상 세균 3 종(*Ralstonia solanacearum*, *Serratia marscens*, *Paenibacillus polymixa*)의 세균현탁액(3 × 10⁸ cfu/mL) 0.2 mL을 각각 45°C의 0.7% 물한천 4 mL와 혼합하였다. 억제 대상 곰팡이 2 종(*Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*)의 포자 용액(5 × 10⁷ spores/mL) 0.2 mL을 0.7% 물한천 4 mL와 혼합하였다. 이후 세균 한천액

과 곰팡이 한천액을 혼증 처리된 동애등에 세균 여과지 위에 올리고 28°C (대조구 *E. coli*는 37°C)에서 48 시간 동안 배양 후 여과지 주변으로 세균 또는 곰팡이 균사 성장 억제 유무를 관찰하였다.

동애등에 장내세균의 주요 영양소 분해 능력 분석

장내세균의 영양소에 따른 소화효소 생산능력은 Jeon et al. (2011)의 방법을 따라 조사하였다. 아밀레이즈 분해효소 검정 배지는 0.3% beet extract (BD Difco, Sparks, Maryland, USA), 2% soluble starch (Katayama Chemical, Osaka, Japan), 0.5% peptone, 0.5% NaCl, 1.5% agar (Duksan Pure Chemicals, Ansan, Korea)로 구성되었다. 지질 분해효소 검정배지는 1% Tween 80 (Daejung-Hwakeum, Siheung, Korea), 1% peptone, 0.5% NaCl, 0.01% CaCl₂ (Junsei Chemical, Tokyo, Japan), 1% agar로 구성되었다. 섬유소 분해효소 검정배지는 1% sodium carboxymethyl cellulose, 1% tryptone (MBcell, Seoul, Korea), 0.5% yeast extract (MBcell), 1% NaCl, 1.5% agar로 구성되었다. 단백질 분해효소 검정배지는 0.5% casein, 0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 1% skim milk (BD Difco), 1.5% agar로 구성되었다. 동애등에 장내세균을 각 검정배지에 접종하고 28°C에서 24 시간동안 배양한 다음 단백질 분해효소 유무는 투명대를 나타내는지 확인하고, 섬유소 분해효소 분비/생산 유무는 0.1% Congo red로 염색시킨 다음 1 M NaCl로 세척 후 균총 주변의 갈색 halo를 나타내는지 확인하였고, 아밀레이즈 분해효소 유무는 2% Lugol 용액을 뿌린 후 곧바로 균총 주변의 투명대를 형성하는지 확인하였다. 지질 분해효소 생산 유무는 불용성 침전물이 생기는 지를 확인하였다.

결과

아메리카동애등에 장내세균 밀도

종령 유충의 동애등에 소화관을 적출하여 부위별로 크기와 세균을 분석하였다(Fig. 1). 소화관은 체강에 여러 겹으로 접혀 있는 모습으로 존재했다. 이를 적출하여 관찰하여 본 결과 소화관의 길이는 몸 길이(10 mm)의 약 7 배(약 71 mm)에 달하였다(Fig. 1A). 일반적으로 음식물을 보관하는 전장은 중장에 비해 직경이 더 큰 모습을 나타냈고, 중장과 후장 사이에는 말피기관이 연결되어 있었다. 전장, 중장, 후장의 길이(각각 약 20-25 mm)는 거의 비슷하였다. 소화관으로부터 세균을 적출하여 영양배지에 도말한 결과 쉽게 3 종류의 서로 다른 균총 형태를 관찰할

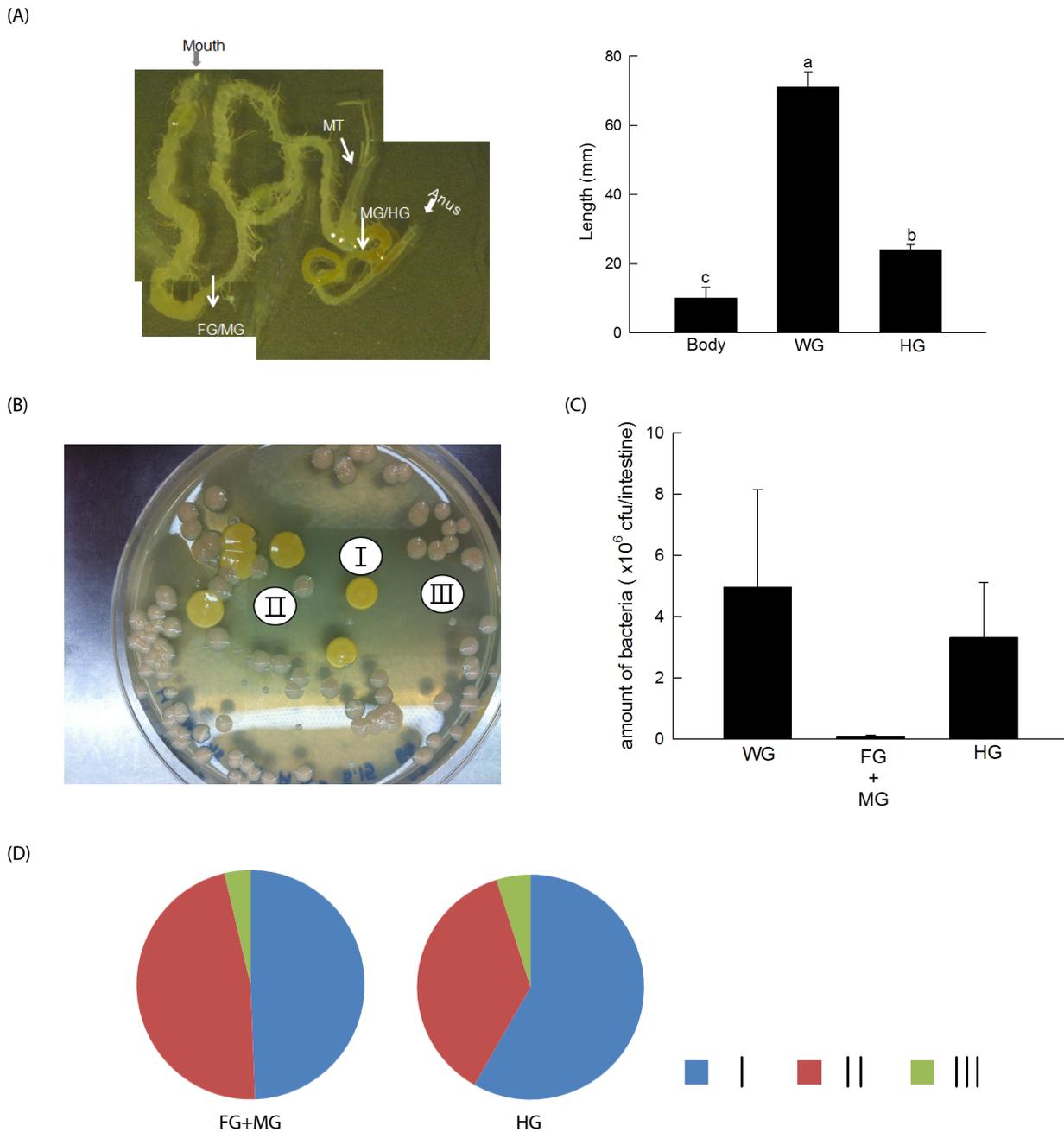


Fig. 1. Isolation of intestinal bacteria of *Hermetia illucens* larvae. (A) Structure of digestive system consisting of foregut ('FG'), midgut ('MG'), and hindgut ('HG'). Malpighian tubule ('MT') is located between MG and HG. The length of a whole intestine ('WG') is compared with body length ('Body') or HG length. (B) Three different bacterial colonies isolated from HG lumen. (C) Total bacterial densities of each intestinal regions. (D) Relative densities of three bacterial types in each intestinal region. The error bars indicate standard deviations of three independent replications. Different letters above the error bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

수 있었다(Fig. 1B). I 형 균총은 비교적 크고 노란색을 띠었다. II 형 균총은 다소 I 형에 비해 작고, 분홍색을 띠었다. III 형 균총은 매우 소형이고 흰색을 띠었다. 전체 소화관의 세균 밀도는 개체 당 5.0×10^6 cfu, 전장과 중장에 9.4×10^4 cfu로 전체 소화관 세균 가운데 1.9%를 차지하며, 후장에서는 3.3×10^6 cfu로

전체의 98.1% 세균 밀도를 차지했다(Fig. 1C). I과 II 균주가 우점종을 이루며 소화관에 분포하지만, 이 가운데 I 균주가 후장에 더 많이 분포하는 것으로($X^2 = 147.6$; $df = 2$; $P < 0.0001$) 나타났다(Fig. 1D).

Table 1. Identification of three bacterial isolates (I, II, III) of the intestine of *Hermetia illucens* using Biolog microbial identification system

Carbon sources	Isolate and bacteria ¹					
	I	Mm	II	Pr	III	Bh
Water	-	-	-	-	-	-
α-Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	-	-	+	+	+
Glycogen	-	-	-	+	-	-
Tween 40	-	-	-	+	+	-
Tween 80	+	-	+	+	+	-
N-Acetyl-D-galactosamine	+	+	-	+	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	NA	NA
Adonitol	+	-	+	+	NA	NA
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	+	-	+	+	+	-
D-Cellobiose	+	-	-	-	+	+
I-Erythritol	+	-	+	+	NA	NA
D-Fucose	+	+	+	+	NA	NA
L-Fucose	-	-	-	-	NA	NA
D-Galactose	+	+	+	+	+	-
Gentiobiose	-	-	-	-	-	+
α-D-Glucose	+	+	+	+	-	+
m-Inositol	+	-	+	+	-	-
α-D-Lactose	-	-	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	+	-	+	+
D-Mannitol	+	-	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	-	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-	-	+
β-Methyl-D-glucoside	+	-	-	+	-	-
D- Psicose	-	-	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	-	+	+	+	-
D-Sorbitol	+	-	+	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	+	+
D-Trehalose	-	+	-	-	+	-
Turanose	-	-	-	+	+	+
Xylitol	+	+	-	-	+	+
Methyl pyruvate	+	+	+	+	NA	NA
Mono-methyl succinate	+	+	-	+	NA	NA
Acetic acid	-	+	+	+	+	-
cis-Aconitic acid	+	-	+	+	NA	NA
Citric acid	+	-	-	+	NA	NA
Formic acid	+	+	+	+	NA	NA
D-Galactonic acid lactone	-	-	-	-	NA	NA
D-Galacturonic acid	-	-	-	-	-	-
D-Gluconic acid	+	+	+	+	+	-
D-Glucosamic acid	+	-	+	-	NA	NA
D-Glucuronic acid	+	-	-	-	NA	NA
α-Hydroxybutyric acid	+	+	-	-	+	+
β-Hydroxybutyric acid	-	-	-	-	-	+
γ-Hydroxybutyric acid	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxyphenyl acetic acid	+	-	+	+	+	-
Itaconic acid	-	-	-	-	NA	NA

Carbon sources	Isolate and bacteria ¹					
	I	Mm	II	Pr	III	Bh
α-Ketobutyric acid	+	+	-	-	NA	NA
α-Ketoglutaric acid	+	-	-	+	-	+
α-ketovaleric acid	-	+	-	-	-	+
D,L-Lactic acid	+	+	+	-	NA	NA
Malonic acid	-	-	-	-	NA	NA
Propionic acid	+	+	-	-	+	+
Quinic acid	-	-	-	-	NA	NA
D-Saccharic acid	-	-	-	-	NA	NA
Sebacic acid	-	-	-	-	NA	NA
Succinic acid	+	+	+	+	+	-
Bromosuccinic acid	+	+	-	+	NA	NA
Succinamic acid	-	+	-	+	-	-
Glucuronamide	+	-	+	-	NA	NA
L-Alaninamide	+	-	+	-	-	-
D-Alanine	+	-	+	+	+	-
L-Alanine	+	+	+	-	+	-
L-Alanyl-glycine	+	+	+	+	-	-
L-Asparagine	+	+	+	+	+	-
L-Aspartic acid	+	+	+	+	NA	NA
L-Glutamic acid	+	+	+	+	+	-
Glycyl-L-aspartic acid	+	+	+	+	NA	NA
Glycyl-L-glutamic acid	+	+	+	+	+	-
L-Histidine	+	-	+	+	NA	NA
Hydroxy-L-proline	+	-	+	+	NA	NA
L-Leucine	+	+	+	+	NA	NA
L-Ornithine	-	-	-	-	NA	NA
L-Phenylalanine	-	+	-	+	NA	NA
L-Proline	+	+	+	+	NA	NA
L-Pyroglutamic acid	+	-	+	+	+	-
D-Serine	+	+	+	+	NA	NA
L-Serine	+	+	+	+	+	-
L-Threonine	+	+	-	-	NA	NA
D,L-Carnitine	-	-	-	+	NA	NA
γ-Aminobutyric acid	-	-	-	-	NA	NA
Urocanic acid	+	-	+	-	NA	NA
Inosine	+	+	+	+	-	+
Uridine	+	+	+	+	-	+
Thymidine	+	+	+	+	+	+
Phenylethylamine	+	-	-	-	NA	NA
Putrescine	-	-	-	-	-	-
2-Aminoethanol	-	-	-	-	NA	NA
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+
D,L,α-Glycerol phosphate	+	+	+	+	-	-
α-D-Glucose-1-phosphate	+	+	+	+	+	-
D-Glucose-6-phosphate	+	+	+	+	+	-
Inulin	NA	NA	NA	NA	-	-
Mannan	NA	NA	NA	NA	-	+
N-Acetyl-D-mannosamine	NA	NA	NA	NA	+	-
Amygdain	NA	NA	NA	NA	-	-
Arbutin	NA	NA	NA	NA	+	-
D-Fructose	NA	NA	NA	NA	+	+

Carbon sources	Isolate and bacteria ¹					
	I	Mm	II	Pr	III	Bh
L-Fructose	NA	NA	NA	NA	-	-
Maltotriose	NA	NA	NA	NA	+	+
D-Melezitose	NA	NA	NA	NA	+	-
α-Methyl-D-galactoside	NA	NA	NA	NA	-	-
β-Methyl-D-galactoside	NA	NA	NA	NA	-	-
3-Methyl-glucose	NA	NA	NA	NA	-	+
α-Methyl-D-glucoside	NA	NA	NA	NA	-	-
α-Methyl-D-mannoside	NA	NA	NA	NA	-	+
Palatinose	NA	NA	NA	NA	-	-
D-Ribose	NA	NA	NA	NA	+	+
D-Salicin	NA	NA	NA	NA	+	+
Sedoheptulose	NA	NA	NA	NA	-	-
Stachyose	NA	NA	NA	NA	-	-
D-Tagatose	NA	NA	NA	NA	-	-
D-Xylose	NA	NA	NA	NA	-	+
Lactamide	NA	NA	NA	NA	-	+
D-Lactic acid methylester	NA	NA	NA	NA	+	-
L-Latic acid	NA	NA	NA	NA	+	+
D-Malic acid	NA	NA	NA	NA	+	-
L-Malic acid	NA	NA	NA	NA	+	-
Methyl pyruvate	NA	NA	NA	NA	+	-
Succinic acid mono-methyl ester	NA	NA	NA	NA	-	-
Pyruvic acid	NA	NA	NA	NA	+	+
N-Acetyl-L-glutamic acid	NA	NA	NA	NA	-	-
2'-Deoxy adenosine	NA	NA	NA	NA	+	+
Adenosine-5'-monophosphate	NA	NA	NA	NA	+	-
Thymidine-5'-monophosphate	NA	NA	NA	NA	-	-
Uridine-5'-monophosphate	NA	NA	NA	NA	-	+
D-Fructose-6-phosphate	NA	NA	NA	NA	+	-
Adenosine-5'-monophosphate	NA	NA	NA	NA	+	-
Character homology	71.8% (69/96)		77.1% (74/96)		53.7% (51/95)	
Identity from Biolog database	61.9%		35.50%		64.60%	

¹ Acronyms of 'Mm', 'Bh', and 'Pr' represent *Morganella morganii*, *Bacillus halodurans*, *Providencia rettgeri*, respectively.

² 'NA' represents "Not assessed".

Table 2. Identification of the intestinal bacteria collected from *Hermetia illucens* using 16S rDNA sequencing

REP ¹	bp	Blast match				
		Species	GB# ²	Identity (%)	E value	Score
R1	1,699	<i>Proteus mirabilis</i>	JF772100	97	0.0	2174
R2	1,874	<i>Morganella morganii</i>	AB089245	97	0.0	2167
R3	1,989	<i>Providencia rettgeri</i>	HQ407257	93	0.0	2091
R4	1,678	<i>Providencia alcalifaciens</i>	AB480755	96	0.0	2121
R5	1,743	<i>Providencia sp.</i>	JN836927	96	0.0	2036

¹ 'REP' represents restriction enzyme polymorphism resulted from digestions of *AfuI* and *MspI* on 16S rDNA PCR products.

² 'GB#' represents GenBank accession number of the blast match.

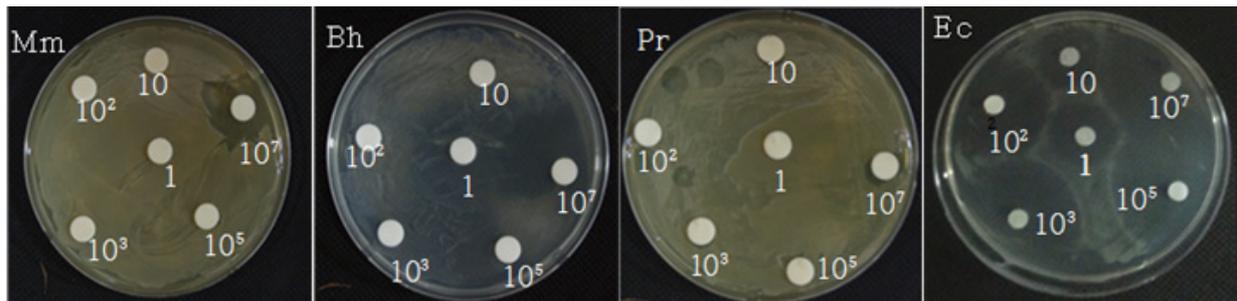
아메리카동애등에 장내세균 동정

동애등에에 존재하는 장내세균은 두 가지 방법으로 세균 동

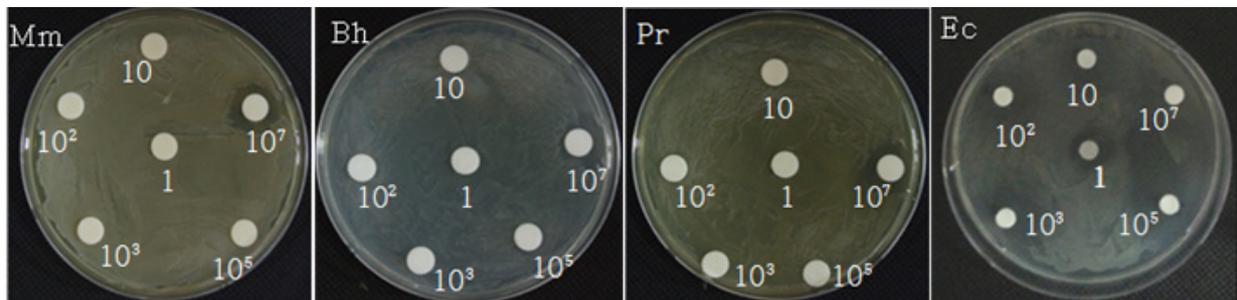
정을 실시하였다. 첫째로 미생물동정장치인 Biolog를 이용하여 생화학적 특성에 바탕을 둔 동정을 실시하였다. 여기에는 3 가지 상이한 장내세균을 대상으로 동정을 실시하였다(Table 1).

Table 3. Minimum concentrations (ppm) of antibiotics to inhibit the growth of three intestinal bacterial species of *Hermetia illucens*

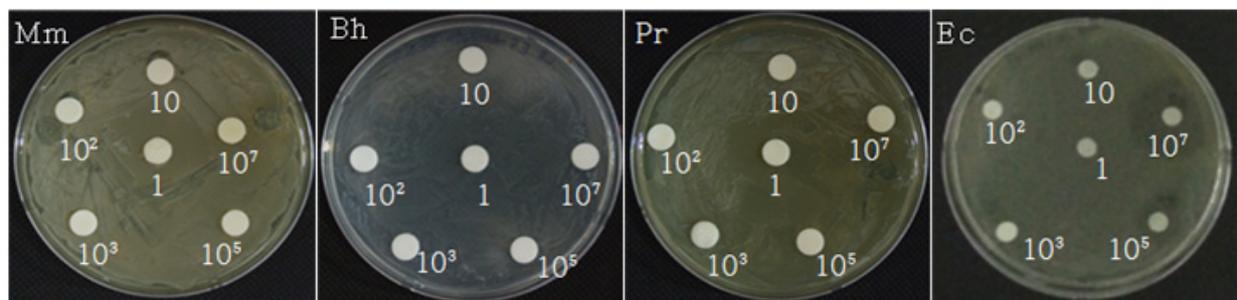
Isolate	Ampicillin	Kanamycin	Tetracycline	Streptomycin sulfate
<i>Morganella morganii</i> (Mm)	10^7	10^7	$>10^7$	10^7
<i>Bacillus halodurans</i> (Bh)	10^5	10^7	10^5	10^7
<i>Providencia rettgeri</i> (Pr)	$>10^7$	10^7	$>10^7$	10^7
<i>Escherichia coli</i> (Ec)	1	1	10^7	1



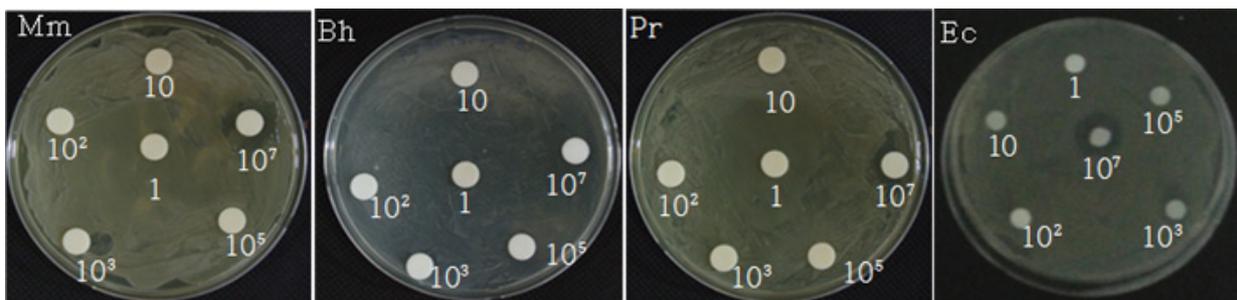
Ampicillin



Kanamycin



Tetracycline



Streptomycin sulfate

Table 4. Antimicrobial activities of three intestinal bacteria of *Hermetia illucens*

Bacterial isolates	Growth inhibition response of test microbes ¹					
	Pp	Rs	Sm	Ec	Pc	Cc
<i>Morganella morganii</i>	+ ²	-	-	+	+	-
<i>Bacillus halodurans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	-	-	-

¹ Microbes of 'Pp' for *Paenibacillus polymyxa*, 'Rs' for *Ralstonia solanacearum*, 'Sm' for *Serratia marscens*, 'Ec' for *Escherichia coli*, 'Pc' for *Phytophthora capsici*, and 'Cc' for *Colletotrichum capsici*.

² '+', '-' represent positive or negative response to antimicrobial activity, respectively.

Biolog 동정 결과 I 형 균주는 *Morganella morganii*, II 형 균주는 *Providencia rettgeri*, 그리고 III 형 균주는 *Bacillus halodurans* 로 각각 동정되었다.

다른 방법으로 장내세균을 포괄적으로 동정하기 위해서 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 장내세균을 동정하였다. 이 방법은 메타게놈 방식을 취하여 장내세균 전체를 대상으로 16S rDNA를 증폭시켰다. 이 PCR 결과 얻은 16S rDNA를 제한효소로 잘라 단편 다형을 기준으로 상이한 16S rDNA를 선별하고, 이들을 염기서열 분석하였다(Table 2). 이 결과 5 가지 서로 다른 세균(*Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia sp.*)이 동정되었다. 즉, Biolog에서 동정된 두 가지 주요 세균이 16S rDNA 동정에서도 검출되었다.

아메리카동애등에 장내세균의 항생제 내성

미생물동정장치로 동정된 세 종의 세균에 대해서 항생제 내성 분석이 실시되었다. 세 세균 모두는 분석된 4 가지 항생제에 대해서 내성을 나타냈다(Table 3). 대조구로서 사용된 *E. coli* 는 tetracycline을 제외하고 조사된 모든 항생제에서 최소 농도인 1 ppm을 견디지 못하는 반면, 동애등에 장내분리 세균은 모두 최소한 10⁵ ppm 또는 심지어 10⁷ ppm 이상의 최소억제 농도를 나타냈다. 세 균주 가운데 주요 세균류인 *M. morganii*와 *P. rettgeri*가 *B. halodurans*에 비해 높은 항생제 내성을 나타내는 것으로 나타났다.

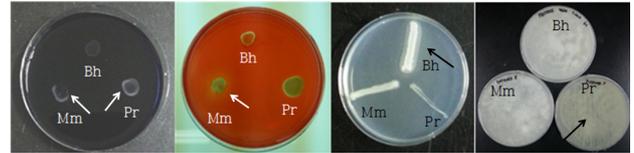
아메리카동애등에 장내세균의 항균활성

세 종류의 동애등에 세균에 대해서 동식물 병원미생물에 대

Table 5. Enzyme activities of three intestinal bacteria of *Hermetia illucens*. Arrows indicate positive responses

Bacterial isolates	Response of enzyme activities			
	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
<i>Morganella morganii</i> (Mm)	+ ¹	+	-	-
<i>Bacillus halodurans</i> (Bh)	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i> (Pr)	+	-	-	+

¹ '+', '-' represent positive or negative response to enzyme activity in each column.



한 항균 활성을 분석하였다(Table 4). 이들 세 종류 중 *P. rettgeri*는 그람양성균인 *P. polymyxa*에 대해서만 항균활성을 보인 반면, *M. morganii*는 그람양성균(*P. polymyxa*), 그람음성균(*E. coli*) 및 곰팡이(*Phytophthora capsici*)에 대해서도 진균 활성을 보였다.

아메리카동애등에 장내세균의 소화효소활성

아메리카동애등에의 광식성을 이해하고자 이 곤충이 갖는 장내세균의 효소활성 분석이 본 연구에서 분리된 세 종류의 장내세균류를 대상으로 분석되었다(Table 5). 세 종류의 세균은 서로 소화효소 활성에 차이를 나타냈다. 아밀레이즈 활성은 *M. morganii*와 *P. rettgeri*에서 나타났다. 그러나 섬유소 분해효소 능력은 *M. morganii*에서만, 지질 분해효소활성은 *B. halodurans*에서만, 단백질 분해효소 활성은 *P. rettgeri*에서만 관찰되었다.

고찰

다양한 먹이 조건에서 성장이 가능한 아메리카동애등에는 음식물 폐기물을 정화시키는 용도로 산업화되고 있다. 그러나 이 곤충의 소화능력에 대한 원리적 연구는 미미하다. 일부 연구는 이 곤충의 전사체를 중심으로 아밀레이즈, 트립신, 카이모트립신, 지질분해효소 및 세린단백질분해효소의 존재를 밝혔고(Park et al., 2013), 주요 영양소를 분해하는 세균류의 동정이 실시되었다(Jeon et al., 2011). 그러나 소화효소 능력이 곤충 자체에서 유래되었는지 아니면 공생 미생물에 의존적인지에 대

해서는 불분명하다. 본 연구는 아메리카동애등에의 세 종류 장내세균을 동정하고, 이들의 소화효소 활성을 각각 분석하였다. 더욱이 이들의 상대 빈도를 분석하였기에 이들의 동애등에 소화력에 미치는 영향을 이해할 수 있게 되었다.

장내세균을 분석하기에 앞서 본 연구는 아메리카동애등에의 소화관 구조를 분석했다. 소화관 전체의 길이는 몸 체장에 약 7 배를 이루는 구조를 나타냈다. 일반적으로 장내 미생물에 소화의존도가 높은 곤충류는 소화관 길이가 증가하고, 다양한 미생물의 미소서식지를 마련하고자 구조의 복잡성을 띠게 된다(Dillon and Dillon, 2004). 특별히 목재류나 부식성 유기물을 섭식하는 곤충류는 후장에 공생 미생물을 갖고 질소 및 탄소를 얻게 된다(Breznak, 2000). 이 후장 영역의 높은 pH 환경은 혐기성 미생물류의 정착과 성장을 도모하게 된다(Clark, 1999). 본 연구는 아메리카동애등에의 후장에 전체 소화관 세균류 가운데 대부분을 차지하고 있다고 보여 동정 세 세균의 정착과 성장에 유리한 환경이 동애등에의 후장에 형성되었을 것으로 추정된다.

아메리카동애등에의 소화관에는 최소 6종류의 배양 가능한 세균이 존재하는 것으로 본 연구에서 조사되었다 생화학적 분석에 기반을 둔 미생물동정장치 Biolog 는 *M. morgani*, *P. rettgeri*, *B. halodurans*를 동정하였고, 16S rDNA에 기반을 둔 동정 결과는 이들 세균 외에 *Proteus mirabilis*, *P. alcalifaciens*, *Providencia* sp. 을 추가하였다. 물론 본 연구는 모두 영양배지에서 성장한 세균을 대상으로 동정하였기에, 이 배지에서 자랄 수 없는 세균은 본 두 가지 기술로 찾아낼 수 없었다. 또한 검출된 모든 세균을 동정하지 않았기에 영양배지에 성장된 세균 가운데에서 누락된 것이 있을 수 있다. 이를 해결하기 위한 방법 가운데 전체 장내 세균을 대상으로 차세대염기서열 분석 방식으로 분석하는 메타게놈분석 전략이 고려할 수 있다. Jeon et al. (2011)은 이와 유사한 전략을 세우고 아메리카동애등에의 소화관에 서식하는 세균을 분석하였다. 먹이 조건에 따라 상이한 세균 종수가 검출되었으나 최대 9,293 종이 검출되었다. 이러한 다양한 세균이 아메리카동애등에에 존재한다는 사실은 최근에 이 소화관 서식 세균 가운데에서 *Paenalcaligenes hermetiae* 라는 신종의 보고를 가능하게 하였다(Lee et al., 2013). 먹이 조건에 따라 장내세균의 종류가 크게 달라지지만 공통적으로 포함된 36 종의 주요 세균 종집단에는 본 연구에서 동정된 *M. morgani*와 *P. rettgeri*가 포함되었으나, 본 연구와 달리 차세대염기서열 분석된 세균 종 다양성에서는 이들 두 세균이 우점종은 아니었다. 이러한 차이는 아마도 본 연구의 동정이 영양배지에서 자라는 세균에서 선발하였기에 소화관 내의 밀도를 대변하기에는 무리가 있었을 것으로 사료된다.

동정된 세 장내세균에 대해서 항생제 내성 및 항균활성 분석이 실시되었다. 세 세균 모두는 분석된 모든 항생제에 대해서 높은 내성을 보였다. 이들 장내세균의 높은 항생제 내성은 다양한 먹이원에서 비롯되는 화학물질에 대한 내성으로 해석되고 이는 이들이 장내 서식하는 데 필수적 생리 현상으로 고려될 수 있다(Basset et al., 2003). 이러한 항생제 내성은 장내 조건이 다양한 세균 간에 유전자 교환이 비교적 활발히 일어나기에(Watanabe et al., 1998; Watanabe and Sato, 1998) 타 세균으로부터 항생제 내성 유전자의 획득에 기인하였을 것으로 사료된다. *M. morgani*와 *P. rettgeri*는 모두 그람양성균에 대한 항균활성을 나타냈고, *M. morgani*는 더불어 그람음성균에 대한 항균활성과 진균활성을 모두 보였다. 일반적으로 공생 미생물의 기주에 대한 공헌도는 난분해 물질의 소화를 통한 영양물질 제공 뿐만 아니라 해로운 미생물의 증식을 억제하는 역할을 담당한다(Berg, 1996). 잎말이나방류인 *Homona magnanima* 유충이 무균상에서 성장될 경우 장내미생물을 갖는 대조구 개체에 비해 곤충병원세균인 *Bacillus thuringiensis*에 대해서 20 배 이상 감수성이 되기에 장내 세균이 병원성 세균의 성장을 억제한다고 제시하였다(Takatsuka and Kunimi, 2000). 본 연구에서도 동정된 *Proteus mirabilis*는 검정파리 장내에서 방향성 대사물질을 분비하여 병원성 세균의 증식을 억제하였다(Erdmann, 1987). 메뚜기류에서도 곤충병원성곰팡이(*Metarhizium anisopliae*)의 소화관 정착을 억제하는 데 장내세균이 역할을 담당하였다(Dillon and Charnley, 1988). 따라서 아메리카동애등에 장내세균의 항생능력은 기주 곤충을 감염시키는 곤충병원성 미생물의 정착 및 증식을 억제하는 데 중요한 방어 역할을 담당할 것으로 사료된다. 그러나 아메리카동애등에 소화관에서 분리된 세균들이 모두 기주와 공생관계를 갖는 지에 대해서는 본 연구로서 정확히 규명하기 어렵다. 일반적으로 곤충과 세균 사이에 공생관계는 편리공생(commensalism)과 상생공생(mutualism)으로 나눌 수 있다. 따라서 이러한 공생세균은 기주 곤충의 생존과 발육에 요구되며, 병원성 미생물과 구별되어야 한다. 곤충의 면역 인식체계는 패턴인식 방식으로 세균의 경우 곤충 조직에 없는 펩티도글라이칸 구조에 의해 패턴 인식을 받게 된다(Park and Lee, 2012). 곤충의 소화관의 경우도 이 패턴인식으로 IMD 면역신호가 유발되고, 이에 따라 항생단백질들이 발현되게 된다. 이 항생단백질은 공생세균도 예외가 될 수 없어 이를 인식하고 발현하게 된다. 물론 이 항생단백질은 공생세균에게도 치명적이어서 공생세균은 보호받고, 병원세균에만 선택적으로 억제시키는 기구가 존재해야 한다. 최근의 초파리 공생세균의 연구에 따르면 이 소화관의 항생단백질 발현에 전사 억제자인 *Caudal*이 작용한다고 보고하였다(Ryu et al., 2008).

따라서 공생세균에 치명적인 항생단백질의 발현은 억제시켜 공생세균을 보호하고, 이 공생세균은 병원세균의 정착과 증식을 억제한다고 제시하였다. 이러한 연구를 토대로 공생세균을 보호하기 위한 다양한 조절자들이 보고되었다. 예로서, PGRP 영역을 갖고 있는 PGRP-SC와 PGRP-LB는 DAP 유형의 펩티도글라이칸을 분해하여 면역 유발을 억제하였다(Bischoff et al., 2006; Zaidman-Remy et al., 2006). 또 다른 억제자는 PGRP-LC 수용체에 길항제로 작용하는 PIMS로서 IMD 면역 신호를 억제하는 것으로 밝혀졌다(Lhocine et al., 2008). 또 다른 장내 병원미생물의 증식을 억제하는 수단이 활성산소(reactive oxygen species: ROS)로서 Ha et al. (2005b)은 immune-regulated catalase (IRC)가 없는 초파리의 경우 소화관의 세균 감염에 치명적이라고 보고하였다. 특별히 산화효소인 Duox가 소화관의 병원성 세균 감염 억제에 작용한다고 밝혔다(Ha et al., 2005a). 그러나 아직 병원성세균과 공생세균을 어떻게 구분하는 지에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 이에 대한 연구 결과는 곤충과 장내 공생세균과의 관계를 궁극적으로 해석하게 될 것이다.

동정된 세 장내세균은 소화효소활성이 상이하였다. 특별히 *M. Morganii*는 기주 곤충이 분해하지 못하는 섬유소에 대해서 분해활성을 지니고 있어 영양학적 측면에서 중요한 공생 세균으로 작용할 것으로 사료된다. 또한 아밀레이즈 활성, 지질분해 활성 및 단백질 분해 활성을 지니는 이들 장내 세균은 기주의 소화효율을 증가시켜 주는 역할을 담당할 것으로 여겨진다(Dillon and Dillon, 2004). 공생세균의 기주 영양분 공급은 *Buchnera* 세균이 기주 진딧물과의 관계에서 잘 알려지듯이 동애등에의 장내세균은 기주가 부족한 영양분의 공급에 결정적 역할을 담당할 것으로 추정된다(Douglas, 1998).

결론적으로 본 연구 결과는 아메리카동애등에가 소화관에 유용한 기능을 하는 세균을 함유하고 있다고 제시하고 있다. 추후 이러한 세균들과 동애등에 사이에 공생관계를 밝히는 기능적 연구가 진행되어야 한다.

사 사

본 연구는 한국생산기술연구원 국가청정생산지원센터의 “자동 연속 분해시스템의 소음에 대한 동애등에의 생육 특성 규명” 용역연구사업의 지원으로 수행되었다.

Literature Cited

Basset, A., Tzou, P., Lemaitre, B., Bocard, F., 2003. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its

insect vector, *Drosophila melanogaster*. EMBO Rep. 4, 205-209.

Bensen, H.J., 1990. Microbiological applications. 5th ed., 376 pp. Wm. C. Brown Publishers, IA. USA.

Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol. 4, 430-435.

Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I.G., Hoffmann, J.A., Royet, J., 2006. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. PLoS Pathog. 2, e14.

Breznak, J.A., 2000. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites. Oecologia 110, 209-231.

Choi, W.H., Yun, J.H., Chu, J.P., Chu, K.B., 2012. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram-negative bacteria. Entomol. Res. 42, 219-226.

Clark, T.M., 1999. Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalinization in the insect superorder Mecoptera. J. Chem. Ecol. 25, 1945-1960.

Diener, S., Zurbrugg, C., Tockner, K., 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. Waste Manag. Res. 27, 603-610.

Dillon, R.J., Charnley, A.K., 1988. Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacteria flora of the desert locust-characterization of antifungal toxins. Can. J. Microbiol. 34, 1075-1082.

Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: non-pathogenic interactions. Annu. Rev. Entomol. 49, 71-92.

Douglas, A.E., 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annu. Rev. Entomol. 43, 17-37.

Erdmann, G.R., 1987. Antibacterial action of myiasis-causing flies. Parasitol. Today 3, 214-216.

Erickson, M.C., Islam, M., Sheppard, C., Liao, J., Doyle, M.P., 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. J. Food Protect. 67, 685-690.

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., Lee, W.J., 2005a. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. Science 310, 847-850.

Ha, E.M., Oh, C.T., Ryu, J.H., Bae, Y.S., Kang, S.W., Jang, I.H., Brey, P.T., Lee, W.J., 2005b. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. Dev. Cell 8, 125-132.

Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S.B., Choi, Y., Lee, S.J., 2011. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. Curr. Microbiol. 62, 1390-1399.

Ji, D., Kim, Y., 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 50, 489-496.

Ji, D., Yi, Y., Kang, G.H., Choi, Y.H., Kim, P., Baek, N.I., Kim, Y., 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-patho-

- genic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 241-248.
- Kim, W., Bae, S., Kim, A., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., Park, Y., Koh, Y., 2011a. Characterization of the molecular features and expression patterns of two serine proteases in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *BMB reports* 44, 387-392.
- Kim, W., Bae, S., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., Koh, Y., 2011b. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 14, 11-14.
- Landi, S., 1960. Bacteriostatic effect of hemolymph of larvae of various botflies. *Can. J. Microbiol.* 6, 115-119.
- Lee, Y.Y., Lee, J.K., Park, K.H., Kim, S.Y., Roh, S.W., Lee, S.B., Choi, Y., Lee, S.J., 2013. *Paenalcaligenes hermetiae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* In press.
- Lhocine, N., Ribeiro, P.S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., 2008. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe* 4, 147-158.
- Natori, S., 1995. Antimicrobial proteins of insects and their clinical application. *Nippon Rinsho.* 5, 1297-1304.
- Newton, G.L., Booram, C.V., Barker, R.W., Hale, O.M., 1997. Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a supplement for swine. *J. Anim. Sci.* 44, 395-400.
- Park, J., Lee, S., Lee, H., Kim, Y., 2013. Effect of stress sound on the development of the black soldier fly, *Hermetia illucens*. *Korean J. Appl. Entomol.* In Press.
- Park, J.W., Lee, B.L., 2012. Insect immunology, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 480-512.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65.
- Roh, S.W., Nam, Y.D., Chang, H.W., Kim, K.H., Kim, M.S., Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, W.J., Bae, J.W., 2008. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6171-6177.
- Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., Lee, W.J., 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319, 777-782.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour Press, NY.
- Sheppard, D.C., Tomberlin, J.K., Joyce, J.A., Kiser, B.C., Sumner, S.M., 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol.* 39, 695-698.
- Sherman, R.A., Hall, M.J.R., Thomas, S., 2000. Medical maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 55-81.
- Takatsuka, J., Kunimi, Y., 2000. Intestinal bacterial affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invertebr. Pathol.* 76, 222-226.
- Watanabe, K., Hara, W., Sato, M., 1998. Evidence for growth of strains of the plant epiphytic bacterium *Erwinia herbicola* and trans-conjugation among the bacterial strains in guts of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 104-111.
- Watanabe, K., Sato, M., 1998. Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Erwinia cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae. *Curr. Microbiol.* 37, 352-355.
- Yeom, I.H., Jeon, Y.H., Kim, Y., 2012. *Molecular diagnosis of plant disease and insect pests*. GCO Science Publishing, Seoul, Korea.
- Yu, H., Wang, Z., Liu, L., Xia, Y., Cao, Y., Yin, Y., 2008. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Curr. Microbiol.* 56, 391-396.
- Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D., Oh, B.H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B., 2006. The *Drosophila* amidase PGRPLB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* 24, 463-473.
- Zheng, L., Crippen, T.L., Singh, B., Tarone, A.M., Dowd, S., Yu, Z., Wood, T.K., Tomberlin, J.K., 2013. A survey of bacterial diversity from successive life stages of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) by using 16S rDNA pyrosequencing. *J. Med. Entomol.* 50, 647-658.