



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A. C.**

**BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL SELECTIVO DE  
BACTERIAS INTESTINALES ESENCIALES DE *Aedes aegypti*  
(Diptera: Culicidae)**

---

Por:

**Edgar Erasmo Reza Pacheco**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRICOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Erasmo Reza Pacheco la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

---

Dr. Osvaldo López Cuevas  
Director de tesis



---

Dr. Edith Hilario Torres Montoya  
Co-director de tesis

JOSE A. MEDRANO

---

Dr. José Andrés Medrano Félix  
Integrante de comité de tesis



---

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz  
Integrante de comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Bacteriófagos para la Eliminación Selectiva de Bacterias Intestinales Esenciales de *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) como Método de Biocontrol del Vector” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edgar Erasmo Reza Pacheco, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante el posgrado

Gracias al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, (CIAD, A.C.) por abrirme las puertas.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá y a mi novia que siempre me apoyaron y no dejaron que me rindiera.

A mi tía Lety por presentarme al CIAD

A mí al demostrarme a mí mismo que con metas y consistencia a pesar de las adversidades puedo hacer lo que me proponga.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1. Generalidades de <i>Aedes aegypti</i> .....	17
2.1.1. Taxonomía .....	17
2.1.2. Ciclo de Vida .....	18
2.1.3. Ciclo de Transmisión de Arbovirus .....	19
2.2. Estrategias para el Control de <i>Aedes aegypti</i> .....	20
2.2.1. Nuevas Estrategias para el Control de Vectores .....	20
2.2.2. Localización de Bacterias en el Mosquito .....	22
2.2.3. Adquisición de la Biota Bacteriana .....	23
2.2.4. Función de los Simbiontes Bacterianos .....	24
2.2.4.1. Nutrición .....	24
2.2.4.2. Reproducción .....	25
2.2.4.3. Inmunidad .....	26
2.2.4.4. Desarrollo.....	26
2.2.4.5. Metabolismo.....	27
2.3. Bacteriófagos: Una Alternativa Indirecta para el Control Biológico de Mosquitos.....	27
2.3.1. Características Generales de los Bacteriófagos .....	28
2.3.2. Ciclos de Replicación .....	29
2.3.2.1. Ciclo lítico.....	30
2.3.2.2. Ciclo lisogénico.....	30
2.3.3. Uso de Bacteriófagos como Método de Control Biológico.....	32
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Específicos .....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36

## CONTENIDO (continuación)

5.1. Recolección de Mosquitos.....	36
5.2. Identificación Morfológica de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
5.3. Disección de <i>Aedes aegypti</i> y Obtención del Intestino Medio .....	37
5.4. Aislamiento e Identificación de la Biota Bacteriana Intestinal de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
5.4.1. Aislamiento de la Biota Bacteriana Cultivable.....	37
5.4.2. Extracción de ADN Bacteriano .....	38
5.4.3. Amplificación del gen rRNA 16S.....	39
5.5. Aislamiento de Bacteriófagos Líticos Contra Bacterias de la Biota Intestinal de <i>Aedes aegypti</i> .....	41
5.5.1. Toma de muestras .....	41
5.5.2. Enriquecimiento.....	41
5.5.3. Determinación de Bacteriófagos por la Prueba de “Spot” .....	42
5.5.4. Purificación de Bacteriófagos.....	42
5.6. Ensayos de Aplicación de Bacterias y Bacteriófagos en Larvas Gnotobióticas de <i>Aedes aegypti</i> .....	43
5.6.1. Cría de Mosquitos.....	43
5.6.2 Cultivo de Bacterias.....	44
5.6.3. Producción de Larvas Gnotobióticas .....	44
5.6.4 Propagación de Bacteriófagos .....	45
5.6.5 Concentración y Titulación de Bacteriófagos.....	45
5.6.6. Ensayos de Control Biológico de Fagos-Bacterias en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	46
5.6.7. Análisis Estadísticos .....	46
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
6.1. Aislamiento e Identificación de la Biota Bacteriana Intestinal de <i>Aedes aegypti</i> .....	48
6.2. Aislamiento de Bacteriófagos contra Bacterias de la Biota Intestinal de <i>Aedes aegypti</i> ...	50
6.3. Ensayos de Control Biológico de Fagos-Bacterias en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	52
6.3.1. Efecto de <i>Enterobacter xiangfangensis</i> en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	53
6.3.2. Efecto de <i>Klebsiella variicola</i> en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> .....	54
6.3.3. Efecto del Bacteriófago F4MIE en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> .....	55
6.3.4. Efecto del Bacteriófago F4MID en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> .....	56
6.3.5. Efecto de <i>Enterobacter xiangfangensis</i> Infectada con el Bacteriófago F4MIE en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	56
6.3.6. Efecto de <i>Klebsiella variicola</i> Infectada con el Bacteriófago F4MD en el Tiempo de Pupación en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	57
6.3.7. Efecto de <i>Enterobacter xiangfangensis</i> en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> .....	57
6.3.8. Efecto de <i>Klebsiella variicola</i> en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	58
6.3.9. Efecto del Bacteriófago F4MIE en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	59

## CONTENIDO (continuación)

6.3.10. Efecto del Bacteriófago F4MID en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	60
6.3.11. Efecto de <i>Enterobacter xiangfangensis</i> Infectada con el Bacteriófago F4MIE en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	60
6.3.12. Efecto de <i>Klebsiella variicola</i> Infectada con el Bacteriófago F4MID en la Supervivencia de Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	61
6.4. Efecto en el tamaño de pupas de <i>Aedes aegypti</i> por la Exposición a Bacterias y Fagos .....	63
6.5. Proporción Sexual de <i>Aedes aegypti</i> Expuestas a Bacterias y Bacteriófagos .....	65
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>67</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .....	19
2. Adquisición y transmisión de la microbiota intestinal de mosquitos .....	24
3. Representación esquemática de un bacteriófago .....	28
4. Clasificación de los bacteriófagos de acuerdo al ICTV .....	29
5. Esquema general del ciclo lítico de los bacteriófagos por etapas.....	30
6. Esquema general del ciclo lisogénico de los bacteriófagos por etapas .....	31
7. Obtención de calvas.....	51
8. Funciones de supervivencia entre bacterias.....	54
9. Funciones de supervivencia de <i>Enterobacter xiangfangensis</i> .....	58
10. Funciones de supervivencia de <i>Klebsiella variicola</i> .....	59
11. Gráfica de barras de la proporción de tamaño de pupas de <i>Aedes aegypti</i> .....	64
12. Gráfica de barras de la proporción sexual de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	66

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Pagina</b>
1. Puntos de tomas de muestras para la recolección de mosquitos hembra de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
2. Verificación de la calidad del ADN bacteriano extraído.....	39
3. Identificación de las bacterias aisladas del intestino medio de <i>Aedes aegypti</i> basados en la secuenciación del gen rRNA 16S.....	48
4. Cronograma de toma de muestras durante el aislamiento de bacteriófagos.....	52
5. Estado de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> al final del experimento .....	53

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es el vector principal de enfermedades virales, tales como el Dengue, Zika y Chikungunya. Debido a la falta de tratamientos específicos contra los virus, se ha optado por el control del vector. En la última década, los esfuerzos para controlar la proliferación de infecciones arbovirales se han centrado en la descacharrización, liberación de parvadas estériles de mosquitos, el control biológico, y la aplicación de insecticidas de amplio espectro. Sin embargo, este último es ineficiente en el control del mosquito, y nocivo para otros artrópodos, incluyendo especies benéficas como las abejas y abejorros. Un nuevo objetivo sobre el control biológico es la biota bacteriana intestinal de los artrópodos; particularmente en los mosquitos, la cual tiene funciones vitales en su desarrollo, reproducción y capacidad vectorial; por lo que, al eliminar selectivamente bacterias específicas del intestino de los mosquitos se afectarán significativamente algunos de los procesos fisiológicos antes mencionados. La única alternativa conocida para la eliminación selectiva de bacterias son los bacteriófagos líticos. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar bacterias intestinales cultivables y bacteriófagos de *Aedes aegypti* hembra en fase adulta presentes en la ciudad de Culiacán Sinaloa, así como determinar experimentalmente el efecto lítico de los bacteriófagos en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*. Se identificaron 32 especies bacterianas pertenecientes a 13 géneros, predominando los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* y *Micrococcus*. No fue posible la recuperación de bacteriófagos, por lo que se procedió a utilizar fagos previamente aislados y almacenados en el cepario del LANIIA. Estos mostraron diferencias significativas en el tiempo de pupación de las larvas tratadas con *Enterobacter xiangfangensis* infectada con el fago F4MIE y *Klebsiella variicola* infectada con el fago F4MID. Ambos tratamientos tuvieron un efecto en el desarrollo del vector durante la etapa larva-pupa al prolongar su tiempo de pupación hasta un máximo de 14 y 16 días, respectivamente. Por lo tanto, desde una perspectiva de control biológico, la aplicación de bacteriófagos en larvas de *Aedes aegypti* con actividad lítica sobre especies bacterianas específicas pueden ser una potencial estrategia de biocontrol para reducir y/o controlar la población de *Aedes aegypti*.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, bacteriófagos, biota bacteriana

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the primary vector of viral diseases, such as Dengue, Zika, and Chikungunya. Due to the lack of specific treatments against viruses, vector control has been chosen. In the last decade, efforts have focused on finding strategies to stop mosquitoes, such as delimiting, sterile mosquito release, biological control and application of broad-spectrum insecticides. However, the latter is inefficient in mosquito control and harmful to other arthropods, including beneficial species such as bees and bumblebees. A new target for biological control is the intestinal bacteria biota of arthropods; particularly in mosquitoes, it has vital functions in their development, reproduction and vectorial capacity; therefore, by selectively eliminating specific bacteria from the gut of mosquitoes, some of the physiological processes previously mentioned will be significantly affected. The only known alternative for the selective elimination of bacteria are lytic bacteriophages. The objective of this research was to isolate and identify culturable bacteria and bacteriophages from adult female *Aedes aegypti*'s intestine present in Culiacan Sinaloa, as well as to experimentally determine the lytic effect of bacteriophages on the development of *Aedes aegypti* larvae. Thirty-two bacterial species belonging to 13 genera were identified, predominantly the *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, and *Micrococcus* genera. Although the isolation of lytic bacteriophages against the bacterial species under study was not achieved, previously isolated bacteriophages were used for this stage, whose application showed significant differences in the pupation time of the larvae treated with *Enterobacter xiangfangensis* infected with phage F4MIE and *Klebsiella variicola* infected with phage F4MID. Both treatments affected the vector's development during the larva-pupal stage by prolonging its pupation time up to a maximum of 14 and 16 days, respectively. Therefore, from a biological control perspective, applying bacteriophages in *Aedes aegypti* larvae with lytic activity on specific bacterial species can be a potential biocontrol strategy to reduce and/or control the *Aedes aegypti* population.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, bacteriophages, bacterial biota

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV), o enfermedades vectoriales, son causadas por parásitos, virus y bacterias. A nivel mundial se registran más de 700,000 defunciones como consecuencia de las ETV. La mayoría de estas enfermedades son transmitidas por insectos artrópodos, por lo que se denominan enfermedades arbovirales (traducción del inglés “arthropod-borne diseases”), tales como el Paludismo, Dengue, Esquistosomiasis, Tripanosomiasis africana humana, Leishmaniasis, enfermedad de Chagas, Fiebre amarilla, Encefalitis japonesa y Oncocercosis (OMS, 2020). Particularmente en el caso del virus del Dengue, se estima que aproximadamente 3,900 millones de personas en más de 128 países corren el riesgo de contraer la enfermedad, y se confirman en promedio 96 millones de casos cada año. La mayoría de estas personas viven en zonas tropicales y subtropicales, con climas cálidos donde se favorece la transmisión de ETV. Por otra parte, el paludismo (ETV de origen parasitaria causada por *Plasmodium*) en 2020, tuvo 241 millones de casos y 627,000 muertes a nivel mundial (CENAPRECE, 2017; WHO, 2022).

Se les denomina como vectores a aquellos organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas de persona a personas, o de animales a personas. Muchos de esos vectores son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado (persona o animal) y posteriormente los inoculan a un nuevo huésped al ingerir su sangre. Los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos. También las garrapatas, moscas, flebótomos, pulgas, triatominos y algunos caracoles de agua dulce son organismos vectores de enfermedades (OMS, 2020).

Los mosquitos, por ser los vectores más importantes, también son los mayormente estudiados. Hasta el momento se reportan aproximadamente 3,500 especies de mosquitos en todo el mundo (Strand, 2018); sin embargo, solo unas pocas están relacionadas con la transmisión de enfermedades. *Culex pipiens* (el mosquito trompetero) es el responsable de transmitir el virus del Nilo Occidental, causante de la fiebre del Nilo Occidental; *Anopheles gambiae* es responsable de transmitir parásitos del género *Plasmodium* (agente causal de la malaria o paludismo); *Aedes*

*aegypti* y *Aedes albopictus* (mosquito tigre), los vectores primario y secundario, respectivamente, de los virus del Dengue, Zika y Chikungunya (Weaver y Reisen, 2009; OMS, 2017).

*Aedes aegypti* es el principal vector transmisor de arbovirus patógenos que afectan a los humanos, como los virus del Dengue, Zika, Chikungunya y el de la Fiebre amarilla (Vontas *et al.*, 2012). El Dengue, antes de 1970, solo había ocasionado epidemias en nueve países del mundo. En la actualidad, es endémico en más de 100 países de las regiones de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. En 2015 tuvo un impacto económico de 1,200 millones de pesos por gastos en prevención y 400 millones de pesos por tratamientos médicos en México (OMS, 2022; DGCS, 2015). El Zika, identificado por primera vez en 1947, registró brotes en África, Las Américas, Asia y el Pacífico. En 2021 ocasionó 21,043 casos y 3,665 confirmados solo en la región de Las Américas (OPS, 2021;) y hasta la fecha, 86 países y territorios han notificado casos de infección por el virus de Zika. Con un impacto económico moderado de aproximadamente un 0.06% del PIB (producto interno bruto) o 3,500 millones de dólares en países de América Latina y el Caribe (BANCO MUNDIAL, 2016). En cuanto a la incidencia de Chikungunya, en 2007 se notificó su transmisión por primera vez en Europa, y en diciembre de 2013 el virus fue detectado por primera vez en la región de las Américas. Desde entonces, el virus se ha extendido por la mayor parte de Las Américas. En 2021 fue responsable de 137,021 casos y 65,538 confirmados solo en la región de Las Américas (OPS, 2021; OMS, 2020).

Con el objetivo de controlar la dispersión de las enfermedades arbovirales mediante la prevención y respuesta temprana a los brotes, la Asamblea Mundial de la Salud de la OMS, en el 2017 aprobó la “Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030”, que ofrece a todos los países las orientaciones estratégicas para el desarrollo y fortalecimiento de medidas de control de los vectores (OMS, 2017). Anteriormente se ha intentado prevenir las infecciones por arbovirus mediante el control de la población de los vectores (principalmente de los mosquitos) mediante estrategias de descacharrización, liberación de parvadas estériles de mosquitos, aplicación de insecticidas organofosforados (Acefato o acephate, el más utilizado), etc. No obstante, existe preocupación por el rápido desarrollo de resistencia de los mosquitos ante los insecticidas y por el impacto negativo que ocasiona en el ambiente (Saldaña *et al.*, 2017).

Con base en esta problemática, y a las gestiones conducidas por autoridades mundiales en la salud, se ha promovido la búsqueda de alternativas que permitan disminuir las poblaciones de mosquitos y la transmisión de enfermedades. Así, investigaciones de la última década se han centrado en determinar el papel de la biota bacteriana intestinal de los mosquitos en su ciclo de vida y cómo el control de su biota intestinal podría tener efectos en el desarrollo y capacidad vectorial de los mosquitos.

Se ha sugerido que en el tracto intestinal de los mosquitos existen bacterias capaces de promover su crecimiento y desarrollo, participando en la asimilación y aprovechamiento de nutrientes (Apte-Deshpande *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha sugerido que existen bacterias que “bloquean” la capacidad vectorial (interacción del vector con el patógeno y la interacción de éste con el hospedero) de los mosquitos, es decir, evitan que los mosquitos adquieran virus patógenos para los humanos, aunque esto no se ha dilucidado completamente y se siguen haciendo estudios al respecto (Coon *et al.*, 2016a; Coon *et al.*, 2016b).

Como resultado de extensas investigaciones, se ha concluido que en el intestino medio de los mosquitos residen grupos bacterianos que viven en estrecha simbiosis con el vector, en donde desempeñan funciones vitales, tales como su reproducción, nutrición, metabolismo, inmunidad, etc. En este sentido, Gaio *et al.* (2011), demostraron que al eliminar la biota bacteriana intestinal de *Aedes aegypti* se vio afectada la producción de huevos y la lisis de glóbulos rojos. Apte-Deshpande *et al.* (2012); Carlson *et al.* (2020), demostraron que la presencia de *Serratia odorifera* y *Enterobacter ludwigii*, respectivamente, aumentan la susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* de adquirir el virus del Dengue. De tal manera que la eliminación selectiva de estas bacterias podría representar un avance significativo para la disminución de las enfermedades transmitidas por vectores.

Hasta el momento la única manera conocida para eliminar de manera selectiva a un género/especie bacteriana en el tracto intestinal de animales es mediante el uso de bacteriófagos. Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan y lisan exclusivamente a bacterias. Pueden presentar un amplio rango de hospederos. Estos virus han sido ampliamente utilizados para reducir enfermedades bacterianas en animales y en humanos (Sklar y Joerger, 2001; Jun *et al.*, 2018), en

superficies inanimadas e incluso en alimentos (Leverentz *et al.*, 2003; López-Cuevas *et al.*, 2012); por lo tanto, podrían representar una alternativa para eliminar aquellas bacterias presentes en el tracto intestinal de *Aedes aegypti* que participan en eventos biológicos benéficos para el mosquito. Esta es una novedosa estrategia, pero muy poco explorada para el control de especies bacterianas que participan positivamente en el desarrollo y salud de los mosquitos. Es por ello que el grupo de investigación del LANIIA-CIAD Culiacán ha puesto en marcha la identificación de especies bacterianas en el tracto intestinal de mosquitos hembra de *Aedes aegypti* en Sinaloa, así como el aislamiento de bacteriófagos líticos contra dichas especies bacterianas, con el objetivo de determinar, en primer lugar, el papel que juegan esas bacterias en el desarrollo y salud de *Aedes aegypti*, y, en segundo lugar, obtener bacteriófagos capaces de controlar/reducir las poblaciones bacterianas en *Aedes aegypti* y determinar su potencial utilización como agentes de control del vector.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* es el principal vector transmisor de patógenos arbovirales que afectan a los humanos, como el virus del Dengue, el virus de Zika, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Chikungunya (Vontas *et al.*, 2012). El vector se distribuye en áreas urbanas y suburbanas a través de las regiones tropicales de África, Asia, Australia, el Pacífico Sur, las Américas y algunas partes del Medio Oriente (OMS, 2020). Esta especie está fuertemente asociada con los hábitats creados por humanos y generalmente no se aleja más de 50 m del lugar donde emergió durante todo su ciclo de vida. Los machos se alimentan del néctar de las plantas, mientras que las hembras se alimentan de sangre para producir huevos. Sus hábitos de alimentación son diurnos, mostrando mayor actividad por la mañana y en la tarde al ponerse el sol. Después de la alimentación, buscan lugares oscuros y húmedos para reposar (Nelson, 1986).

#### 2.1.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Aedes aegypti* de acuerdo con Bates (1970) es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: *Culicidae*

Subfamilia: *Culicinae*

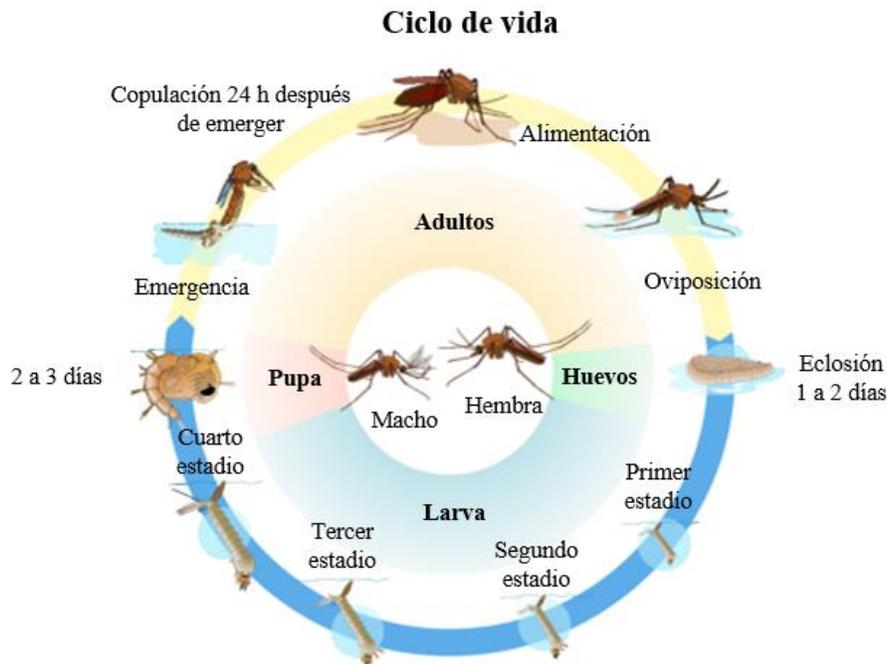
Género: *Aedes*

Subgénero: *Stegomyia*

Especie: *aegypti*

### 2.1.2. Ciclo de Vida

Los mosquitos son organismos holometábolos (figura 1), que durante su ciclo de vida atraviesan por cuatro etapas graduales de metamorfosis: huevo, larva, pupa o ninfa y finalmente el adulto o imago (Nelson, 1986; Minard *et al.*, 2013). Los huevos son blancos al momento de la postura, pero inmediatamente se vuelven de color negro, miden aproximadamente 1 mm de diámetro y en condiciones óptimas el desarrollo embrionario se completa a las 48 horas después de la postura. Una vez mojados, los huevos eclosionan y se liberan las larvas del primer estadio (Nelson, 1986; CENAPRECE, 2015). La fase larval se compone de cuatro estadios distinguibles por el tamaño; es estrictamente acuática y se enfoca principalmente en la alimentación y crecimiento del animal. Se alimentan de plancton, material orgánico acumulado en las paredes del recipiente donde se desarrollan y de microorganismos como bacterias que estén presentes en el agua (Ibañez-Bernal y Martínez-Campos, 1995; CENAPRECE, 2015). A partir del quinto día, empieza la siguiente etapa del mosquito de pupa o ninfa, cuya función es exclusivamente la metamorfosis de la larva a adulto. Tiene forma de coma y por su propiedad de flotabilidad se mantiene en la superficie del agua. Esta fase tarda entre dos y tres días en completarse (Minard *et al.*, 2013; CENAPRECE, 2015). Finalmente, la etapa adulta representa la parte final del ciclo de vida del mosquito y la fase reproductiva de la especie, está adaptada al vuelo y la dispersión de la especie; y, por lo tanto, de las enfermedades arbovirales (Rueda, 2004; CENAPRECE, 2015).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. En condiciones óptimas, el tiempo que tarda en desarrollarse el mosquito desde el huevo hasta su etapa adulta es de 7 a 14 días (Biogents Mosquito Control, 2018).

### 2.1.3. Ciclo de Transmisión de Arbovirus

El ciclo de transmisión comienza cuando un mosquito hembra de *Aedes aegypti*, después de copular, se alimenta de la sangre de un humano infectado por algún arbovirus. Cabe señalar que los mosquitos machos no se alimentan de sangre humana o animal, sino de néctar de plantas, y por lo tanto, no son transmisores arbovirales. Por lo tanto, los mosquitos hembra, una vez alimentados con sangre infectada adquirirán el virus y serán capaces de transmitirlo a humanos en picaduras posteriores (Cheng *et al.*, 2016; Tol y Domopoulos, 2016). El tiempo que el virus tarda en replicarse en el mosquito y hasta que es capaz de transmitirse a los humanos es conocido como periodo de incubación extrínseco. En el caso del virus del Dengue, este periodo generalmente oscila entre 7 y 14 días (Tjaden *et al.*, 2013).

## 2.2. Estrategias para el Control de *Aedes aegypti*

Para que el control del vector sea eficaz, es necesario realizar una estricta vigilancia entomológica y adoptar enfoques que aborden todas las etapas de la vida del mosquito y que procuren la participación total de las comunidades. Dentro de las características de una estrategia de control del vector se destacan cinco puntos primordiales, cada uno con diferentes acciones: 1.-promoción, comunicación de riesgos, participación comunitaria y legislación; 2.-colaboración dentro del sector de la salud y con otros sectores; 3.- enfoque integrado de control de enfermedades; 4.- toma de decisiones en función de las pruebas y 5.- desarrollo de la capacidad (infraestructura, recursos económicos y humanos). Tomando en consideración lo anterior, una medida de intervención propuesta por la UNICEF durante un brote consiste en: (1) control de gestión ambiental (reducción de focos y protección personal), (2) uso de químicos (reguladores de crecimiento de los insectos y larvicidas), (3) uso de agentes biológicos (organismos predadores, parásitos o competidores de la especie o aquellos que reducen su población). Por ejemplo, emplear copéodos, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Wolbachia*, como métodos de control natural contra los vectores. Además, desarrollar estrategias de modificación genética de organismos (técnicas de esterilización y modificación genética de mosquitos) (UNICEF, 2016).

### 2.2.1. Nuevas Estrategias para el Control de Vectores

Las estrategias actuales basadas en métodos químicos y métodos biológicos para el control de *Aedes aegypti* no han tenido el éxito esperado, ya que los métodos químicos como larvicidas e insecticidas han generado un impacto negativo en el ambiente, como la afectación de otras especies de insectos polinizadores y la generación de resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos; por otra parte, los métodos biológicos, ya sean depredadores, parásitos o competidores de la especie; no son factibles porque solo se manejan en grandes cantidades y en cuerpos de agua grandes, como pozos y lagos; por lo que utilizarlos en los lugares pequeños en donde se reproducen los mosquitos es inútil y muy costoso. Esto se refleja en la dispersión y aumento de las diferentes

especies de mosquitos y ahora podemos encontrarlas en lugares donde no habían sido registradas anteriormente. Por ejemplo en zonas templadas de Asia y América; como Japón (OMS, 2017).

Los métodos biológicos han demostrado su eficacia contra los mosquitos, basados en la utilización de organismos que depredan o parasitan las poblaciones de las especies que se pretende controlar. Por ejemplo, se han empleado peces larvívoros y copépodos depredadores (caracoles de agua dulce) para el control biológico de *Aedes aegypti*. Se han usado peces Guppy (*Poecilia reticulata*) y tilapias (*Oreochromis niloticus*) en la lucha de *Aedes aegypti* local e internacionalmente, ya que es considerada una práctica segura y efectiva (OMS, 2020). Se ha demostrado que estos peces pueden consumir grandes cantidades de larvas de mosquitos; sin embargo, debido a los pequeños ambientes en donde se desarrollan las larvas de los mosquitos *Anopheles* y *Aedes*, se vuelve difícil y poco práctica la liberación de peces en estos lugares. Además, los mosquitos hembra adultos son discriminatorios en la selección de sitios de oviposición, ya que utilizan señales químicas para evitar aguas con poblaciones de peces u otros depredadores (Azevedo-Santos *et al.*, 2016). En el caso de los copépodos, es necesario efectuar constantemente reintroducciones de estos crustáceos para mantener controladas las poblaciones de mosquitos (OMS, 2020).

Con base en esta problemática, se están buscando alternativas que aporten avances en el control del vector, y por ende, en el control de las enfermedades transmitidas por éstos. En la última década ha aumentado la investigación en torno al papel que juegan los microorganismos del tracto intestinal de los mosquitos en su fisiología y desarrollo, así como de la posible aplicación de microorganismos específicos para controlar las enfermedades transmitidas por vectores. Por ejemplo, la técnica de paratransgénesis, usada para combatir la diseminación del mosquito y así como reducir la incidencia de dichas enfermedades. Se basa en el uso de bacterias simbióticas genéticamente modificadas que expresen moléculas efectoras dentro del vector. Estas bacterias son reintroducidas en el tracto intestinal de los mosquitos, donde producen el efecto deseado ya sea interfiriendo en su reproducción y/u ovogénesis y embriogénesis (Wilke y Marrelli (2015).

Un ejemplo estudiado en la paratransgénesis es el caso de *Wolbachia*, una bacteria Gram negativa intracelular obligada que infecta de manera natural a muchas especies de mosquitos. Básicamente actúa produciendo moléculas efectoras que impiden el desarrollo de los huevos mediante

mecanismos de incompatibilidad citoplasmática, inhibición de la replicación viral y acortan el tiempo de vida del mosquito (Wike y Marrelli, 2015). En un estudio realizado por Walker *et al.* (2011), se demostró que los títulos del virus del Dengue (DENV-2) disminuyeron hasta en tres logaritmos en *Aedes aegypti* cuando fueron infectados con *Wolbachia* modificada genéticamente, en comparación con mosquitos no inoculados con la bacteria.

Estas investigaciones parten del principio de que los mosquitos son organismos holobiontes que se encuentran en estrecha simbiosis con su microbiota bacteriana. Es decir, dichas bacterias participan activamente en algunos de los procesos fisiológicos vitales para el mosquito, tales como la nutrición, metabolismo, reproducción, desarrollo y resistencia a la colonización por patógenos. En este sentido, diversos investigadores proponen que conocer el papel que juegan estas bacterias en la biología del mosquito permitirá desarrollar nuevas estrategias para el control del vector (Coon *et al.*, 2014; Jupanakul *et al.*, 2014; Saldaña *et al.*, 2017; Strand, 2018).

### **2.2.2. Localización de Bacterias en el Mosquito**

Generalmente, las comunidades bacterianas asociadas con los insectos se clasifican en dos categorías: simbioses primarios (endosimbiontes obligados), los cuales han co-evolucionado con los insectos; y los simbioses secundarios, los cuales se han asociado al insecto en alguna etapa de su desarrollo y no son obligados (Minard *et al.*, 2013).

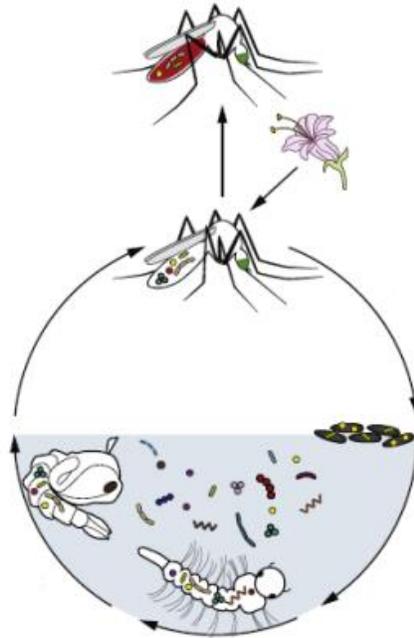
Los mosquitos albergan diversas comunidades de bacterias que colonizan y crecen dentro de sus tejidos, principalmente en el tracto gastrointestinal y en menor medida en las glándulas salivales, divertículo ventral y órganos sexuales (Gaio *et al.*, 2011; Minard *et al.*, 2013). La estructura básica del tracto digestivo de los mosquitos consta de tres regiones: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. El intestino medio ha sido el órgano mayormente estudiado, ya que es el sitio en donde se lleva a cabo la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes; además, es donde ocurren múltiples interacciones entre el mosquito, su biota bacteriana intestinal y los arbovirus ingeridos con la sangre. Esa interacción tripartita es recíproca, es decir, la condición en

una de ellas tiene influencia en las otras dos (Ramírez *et al.*, 2012; Tol y Dimopoulos, 2016; Lee *et al.*, 2017).

### 2.2.3. Adquisición de la Biota Bacteriana

Diversos estudios han demostrado que los mosquitos adquieren su biota bacteriana principalmente de dos formas: directamente del ambiente en el que se desarrollan o heredados por sus progenitores [figura 2] (Colman *et al.*, 2012). Con base en la información disponible, Strand (2018), concluyó que los mosquitos de cada generación adquieren su biota bacteriana intestinal predominantemente del ambiente en donde éstos se desarrollan, indicando que el microbioma bacteriano de los mosquitos es muy variado (figura 2). En este sentido, en un estudio realizado en Brasil para identificar la microbiota cultivable del intestino medio de mosquitos salvajes y de laboratorio usando espectrometría de masas MALDI-TOF, encontraron que los géneros *Bacillus*, *Ewingella*, *Micrococcus*, *Klebsiella* y *Pantoea* fueron los predominantes (Araújo *et al.*, 2019). Por otra parte, en Colombia, utilizando la misma técnica, identificaron a los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Escherichia* (Molina-Henao *et al.*, 2019). Apte-Deshpande *et al.* (2012), en la región de Pune en la India, identificaron mediante secuenciación del rRNA 16 S a los géneros *Aeromonas*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* como los predominantes en la mayoría de sus aislados; además, se identificó a *Serratia odorifera* como la bacteria que estuvo presente en todos los mosquitos analizados. Por último, López-Guerrero (2019) en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, obtuvo 22 aislados bacterianos del intestino medio de *Aedes aegypti* hembras, recolectados en diferentes zonas de la ciudad. Posterior a la técnica de tinción Gram, el grupo de mayor prevalencia correspondió a cocos Gram positivos (10 aislados), bacilos Gram negativos (8 aislados) y en menor proporción bacilos Gram positivos (4 aislados). Tras un análisis de las secuencias del rRNA 16S en la base de datos de EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>), se identificaron los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Serratia* y *Staphylococcus*, con una diversidad de 17 especies bacterianas y cuyos géneros fueron previamente reportados como parte de la biota bacteriana intestinal de *Aedes aegypti*.

Así, esta información nos brinda un panorama de los géneros bacterianos que se han aislado del intestino medio de *Aedes aegypti* en diferentes partes del mundo y de la diversidad del microbioma intestinal del mosquito.



**Figura 2.** Adquisición y transmisión de la microbiota intestinal de mosquitos (Strand, 2017).

#### 2.2.4. Función de los Simbiontes Bacterianos

Jupatanakul *et al.* (2014), sugieren que la biota intestinal del mosquito tiene gran influencia en procesos fisiológicos vitales para el vector, tales como su digestión, nutrición y metabolismo, lo cual impacta directamente en su reproducción. Además, se ha observado que la ausencia o presencia de dichas bacterias afecta el desarrollo y la inmunidad del insecto, por lo que la alteración de la biota bacteriana intestinal de *Aedes aegypti* podría jugar un papel fundamental al reducir la dispersión de los arbovirus.

2.2.4.1. Nutrición. Las bacterias tienen un rol importante en este proceso y puede ser de diferentes

maneras. En el caso de las bacterias del intestino medio, éstas pueden producir compuestos que son asimilados directamente por el huésped o pueden mejorar la digestión al producir enzimas que facilitan la degradación y asimilación de moléculas complejas (Minard *et al.*, 2013). Sin embargo, en ausencia de estas bacterias intestinales (al generar larvas libres de bacterias), las larvas de los mosquitos no pueden desarrollarse y se acelera su muerte, dado que, al no existir bacterias que metabolizan el alimento de las larvas éstas no asimilan los nutrientes y por consiguiente mueren de inanición (Coon *et al.*, 2014; 2016a; Dickson *et al.*, 2017). En este sentido, De Gaio *et al.* (2011), utilizaron antibióticos para eliminar la microbiota bacteriana de hembras de *Aedes aegypti* y encontraron que al reducir la biota bacteriana se afectó la lisis de los glóbulos rojos, lo cual retarda la digestión de las proteínas de la sangre y finalmente se vio afectada la disponibilidad de nutrientes esenciales para la ovogénesis; lo cual se manifestó con una disminución en la producción de huevos. Las especies de *Enterobacter* y *Serratia* aisladas en este estudio exhibieron actividad hemolítica (desintegración de los glóbulos rojos), lo cual sugiere que estas bacterias producen enzimas que juegan un rol importante en la digestión de la sangre, y así, en la nutrición del mosquito hembra.

2.2.4.2. Reproducción. Existen bacterias simbióticas intracelulares obligadas en el tracto intestinal de *Aedes aegypti*, por ejemplo, Coon *et al.* (2016a), demostraron la contribución de la biota bacteriana intestinal en la producción de huevos por *Aedes aegypti* y *Aedes atropalpus* al comparar larvas axénicas (libres de bacterias intestinales), larvas gnotobióticas (inoculadas con una cepa conocida) y larvas criadas de manera convencional. Concluyeron que *Aedes atropalpus* puede producir su primer carga de huevos sin consumir sangre, pero depende de bacterias específicas de su biota intestinal para producirlos, mientras que *Aedes aegypti* necesita consumir sangre obligatoriamente para producir huevos. Por el contrario, *Wolbachia*, una bacteria intracelular obligada, es capaz de afectar la reproducción de los mosquitos al producir moléculas efectoras que impiden el desarrollo de sus huevos mediante un mecanismo conocido como incompatibilidad citoplasmática (Wilke y Marrelli, 2015). Esto abre un área de oportunidad para estudiar los efectos en la fisiología de los mosquitos al eliminar selectivamente a estas especies bacterianas, ya que la reducción de la fecundidad del mosquito podría ser una estrategia de control para disminuir las ETV.

2.2.4.3. Inmunidad. Se ha sugerido que la biota bacteriana puede influenciar la susceptibilidad intrínseca del vector para infectarse con algún arbovirus, permitir su replicación y posteriormente su transmisión a algún hospedero susceptible (Hegde *et al.*, 2015). Apte-Deshpande *et al.* (2012), eliminaron la biota bacteriana intestinal de *Aedes aegypti* usando antibióticos y recolonizaron el tracto intestinal con la bacteria *Serratia odorifera*. Demostraron que la presencia de esta bacteria en los mosquitos, después de recibir una dosis de sangre infectada con el virus del dengue, aumentaba determinadamente la susceptibilidad del vector a adquirir el virus. Del mismo modo, Carlson *et al.* (2020), demostraron que la exposición de *Enterobacter ludwigii* a larvas de *Aedes aegypti* en las últimas etapas de desarrollo y en adultos pueden influir en la susceptibilidad al virus del Dengue y Zika, posiblemente a través de la inmunidad modulada transestadialmente; es decir, la inmunidad modulada durante la etapa larval permanece en el vector durante las distintas fases de desarrollo hasta llegar a la etapa adulta. A su vez, sugirieron que las diferencias en la microbiota de los hábitats de etapa larvaria podrían dar paso a la infección de los virus en los mosquitos adultos, dado que obtuvieron una reducción significativa en la intensidad de la infección en el grupo de mosquitos que no fueron expuestos a bacterias durante su etapa adulta, pero sí durante su etapa larval. Por otra parte, Molina-Henao *et al.* (2020), identificaron géneros bacterianos del microbioma intestinal de *Aedes aegypti* relacionados con cepas resistentes al virus del Dengue como *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Escherichia*. Demostraron que al eliminar la microbiota de los mosquitos con antibióticos y al inocular sangre infectada con el virus del Dengue en el vector en un periodo de veinticuatro días, la susceptibilidad al virus del Dengue de la cepa resistente aumentó de un 51% a un 86.64%, indicando que la resistencia a la infección del virus puede verse influenciada por la presencia de diferentes microorganismos de la biota intestinal del mosquito. En este sentido, estos resultados pueden contribuir al entendimiento de las interacciones entre bacterias y mosquitos, y a la identificación de posibles candidatos para diseños futuros en el desarrollo de estrategias de control del vector.

2.2.4.4. Desarrollo. Coon *et al.* (2014; 2016 a, b) y Dickson *et al.* (2017), partieron del principio de que la superficie de los huevos acarrea microorganismos al momento de la oviposición, y que las larvas se alimentan de la cáscara del huevo cuando eclosionan. Con base en lo anterior, produjeron larvas axénicas (libres de microbiota intestinal) al esterilizar la superficie de huevos de

diferentes especies de mosquitos y demostraron que las larvas axénicas de cada especie, al mantenerlas bajo un régimen dietario nutricionalmente adecuado pero libre de microorganismos, no se desarrollaban más allá de su primer estadio larval y morían al poco tiempo. En contraste, la inoculación de larvas axénicas con una mezcla de bacterias o con miembros individuales de la biota bacteriana intestinal (larvas gnotobióticas), rescató el desarrollo de los insectos hasta su etapa adulta. En este sentido, estos estudios sugieren que las larvas dependen de las bacterias presentes en su intestino para desarrollarse exitosamente hasta la etapa adulta.

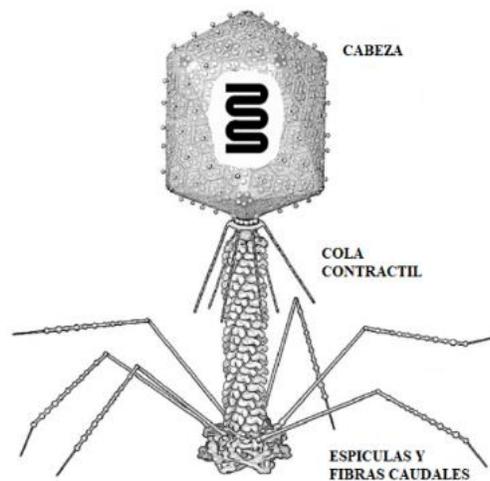
2.2.4.5. Metabolismo. La resistencia a insecticidas en los insectos ha ido generando evidencia que implica a la microbiota del insecto, esto mediante la desintoxicación metabólica de los insecticidas. Por ello, Scates *et al.* (2019), comprobaron que las bacterias intestinales de larvas de *Aedes aegypti* contribuyen a la desintoxicación metabólica y a la reducción en la acción tóxica de los insecticidas naled y propoxur, ya que al reducir las concentraciones bacterianas con antibióticos de amplio espectro se vio reducida la actividad enzimática de P450 y de la esterasa general (enzimas responsables de resistencia metabólica a plaguicidas), ocasionando una desintoxicación metabólica disminuida de ambos insecticidas. Con base en lo anterior, se ha sugerido que los sistemas enzimáticos de las bacterias intestinales participan en el catabolismo de los insecticidas, reduciéndolos a oligoelementos que sirven como fuente de energía para su metabolismo y crecimiento (Russell *et al.*, 2011).

### 2.3. Bacteriófagos: Una Alternativa Indirecta para el Control Biológico de Mosquitos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan exclusivamente a bacterias y tienen un alto nivel de selectividad por género, especie, serotipo e incluso genotipo de bacterias (Ackermann y DuBow, 1987). Su descubrimiento es atribuido al bacteriólogo Ingles Frederick William Twort en 1915 y al científico Franco-Canadiense Félix d'Hérelle en 1917 (Clokier y Kropinski, 2009). Los bacteriófagos son ubicuos y se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Son considerados como las entidades biológicas más abundantes en el planeta, se estima que existen aproximadamente  $10^{31}$  partículas de fagos en el mundo (Gu *et al.*, 2012).

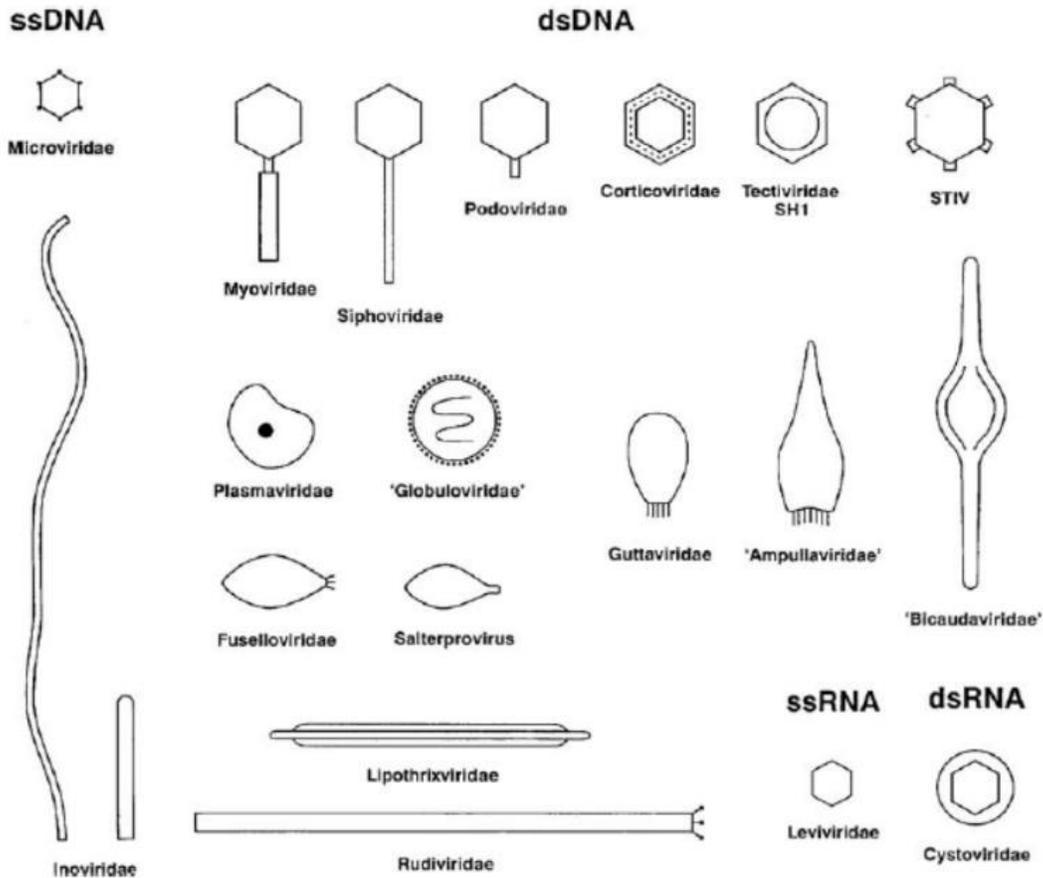
### 2.3.1. Características Generales de los Bacteriófagos

Una partícula de bacteriófago (virión) está compuesta por un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), el cual puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, rodeado por una estructura proteica llamada “cápside” la cual protege el material genético. Más del 96% de los bacteriófagos aislados a la fecha pertenecen al orden *Caudovirales* (que poseen cauda [cola]). En este orden de fagos, unido a la cápside se encuentra el cuello y posteriormente una estructura proteica conocida como “tallo” o “cola” a través de la cual, el bacteriófago inyecta su material genético dentro del huésped. En el extremo del tallo se encuentran las fibras caudales y las espículas, las cuales reconocen a los receptores de las bacterias y permiten la adsorción de la partícula viral (figura 3) (Clokier y Kropinski, 2009).



**Figura 3.** Representación esquemática de un bacteriófago (Harada *et al.*, 2018).

Los miembros del orden de los *Caudovirales* pueden dividirse en cinco familias según la morfología de la cola: *Siphoviridae* (colas largas no contráctiles; 60% de fagos conocidos), *Myoviridae* (colas largas contráctiles), *Podoviridae* (colas muy cortas) y recientemente aceptadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) se encuentran las familias *Ackermannviridae* y *Herelleviridae* (Figura 4) (Moineau, 2013; ICTV, 2021).

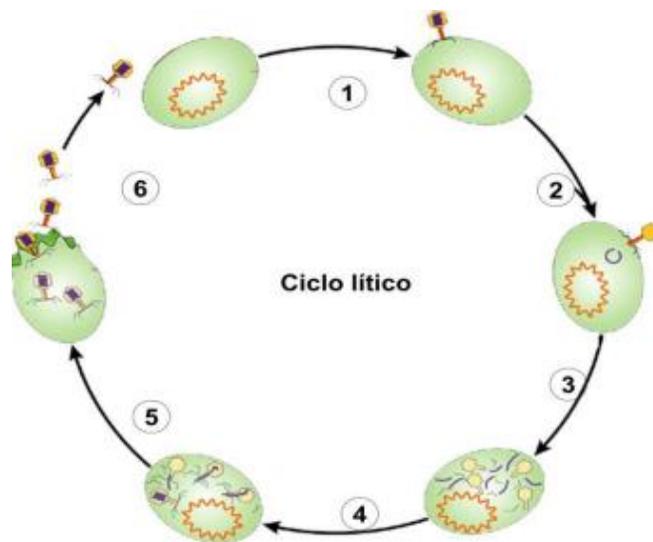


**Figura 4.** Clasificación de los bacteriófagos de acuerdo al ICTV. Representación esquemática de las principales familias y grupos de fagos (Ackerman, 2009).

### 2.3.2. Ciclos de Replicación

El ciclo de replicación de los bacteriófagos sigue una serie de pasos programados, en donde la eficiencia y el tiempo del proceso dependen en gran medida del estado metabólico del huésped. La infección comienza una vez que las fibras caudales y las espículas del fago se unen a las moléculas de reconocimiento específicas (oligosacáridos, polisacáridos, mureína) que se encuentran en la superficie de la bacteria. A este proceso se le conoce como adsorción del fago y es irreversible. Posteriormente, se internaliza el material genético del fago dentro del citoplasma de la bacteria. Una vez que el material genético ha ingresado a la bacteria, este se replica siguiendo el ciclo lítico o el ciclo lisogénico (Ceysens y Lavigne, 2010).

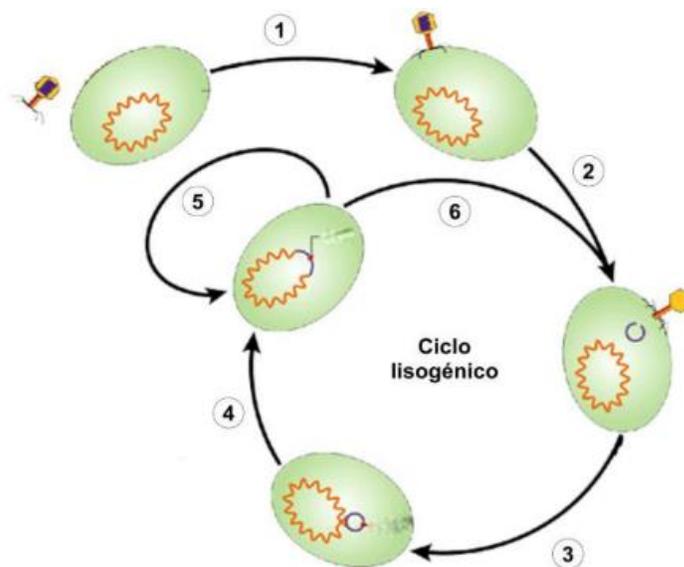
2.3.2.1. Ciclo lítico. Una vez dentro de la bacteria hospedera, el material genético del fago se puede expresar y replicar. El paso inicial generalmente implica el reconocimiento de los promotores del fago por la RNA polimerasa del huésped, lo que conduce a la transcripción de genes tempranos (gen *cII*, *cIII*, *N* y *cro*). Los productos de los genes *cII* y *cIII* activan la síntesis de la proteína de inmunidad *cI*, simultáneamente, el represor *cro* está hecho y actúa como promotor del gen *cI*. La competición entre *cI* y *cro* determina la elección entre el ciclo lítico o vegetativo y el estado lisogénico. Posteriormente, se sintetiza el nuevo ADN del fago, seguido de la síntesis de proteínas estructurales. Después de la síntesis de los componentes macromoleculares, las partículas del fago se ensamblan. El ADN se empaqueta en las cápsides. En un vértice de la cápside se encuentra un punto de partida para el ensamblaje de la cabeza, el sitio de acoplamiento para las enzimas de empaquetamiento del ADN, un conducto para el paso del ADN (vaina) y un sitio de unión para el tallo del fago, el cual se ensambla por separado. Finalmente, los bacteriófagos utilizan dos enzimas: lisina y/u holina para destruir la pared celular del huésped y posteriormente liberar la progenie del fago hacia la matriz extracelular y las células vecinas (figura 5) (Raya y Hébert, 2009).



**Figura 5.** Esquema general del ciclo lítico de los bacteriófagos por etapas. (1) Adhesión del fago a la bacteria, (2) inyección del material genético a la bacteria huésped, (3) replicación del material genético y síntesis de componentes estructurales, (4) ensamblaje de los viriones, (5) lisis de la célula bacteriana y (6) liberación de las nuevas partículas virales (Campbell, 2003).

2.3.2.2. Ciclo lisogénico. En el ciclo lisogénico, el ácido nucleico del bacteriófago se integra en el

genoma de la bacteria huésped, dando lugar al profago. Los fagos lisogénicos (temperados) tienen la capacidad de cambiar entre el ciclo lítico y lisogénico. La elección del ciclo de replicación depende de las tasas de expresión relativas de las proteínas reguladoras *cI*, que promueven la lisogenia, y *cro*, que favorece el ciclo lítico. Durante la lisogenia, el regulador clave es la proteína *cII*, que reprime la transcripción de los promotores líticos y regula positivamente su propia síntesis (Kropinski *et al.*, 2009). El ciclo lisogénico se distingue por dos características: Primero, el profago replica su material genético lo suficiente para permitir que las células huésped hijas hereden al menos una copia del genoma del fago; y segundo, no se producen viriones estructurales, sino que la replicación se produce verticalmente en conjunto con la división de la bacteria huésped. Cabe mencionar que los fagos lisogénicos (temperados) tienen la capacidad de cambiar entre el ciclo lítico y lisogénico bajo ciertas condiciones, tales como desecación, exposición a la luz UV, exposición a químicos mutagénicos, etc. Las condiciones adversas conducen a la producción de proteasas la cual destruye la proteína *cI*. Esto a su vez, conduce a la expresión del gen *cro* y al proceso de multiplicación lítica (figura 6) (Raya y Hébert, 2009).



**Figura 6.** Esquema general del ciclo lisogénico de los bacteriófagos por etapas. (1) Adhesión del fago a la superficie celular bacteriana, (2) inyección del genoma viral, (3) represión del ciclo lítico, (4) integración del genoma viral en el cromosoma bacteriano, (5) replicación celular e (6) inducción del ciclo lítico (Campbell, 2003).

### 2.3.3. Uso de Bacteriófagos como Método de Control Biológico

Los fagos han sido ampliamente utilizados para reducir enfermedades bacterianas en animales y en humanos (Sklar y Joerger, 2001), en superficies e incluso en alimentos (Leverentz *et al.*, 2003; López-Cuevas *et al.*, 2012) y son posiblemente la única alternativa natural para eliminar de manera selectiva a bacterias de interés en el intestino de los mosquitos. Sin embargo, para su utilización como estrategia de control biológico, los bacteriófagos tienen que cumplir con algunos criterios de selección y para ello, es necesario que pasen por estudios de caracterización morfológica, biológica y genómica (Jones *et al.*, 2012).

Dentro de las características deseables que debe poseer un bacteriófago se encuentran el tener amplio rango de hospederos (lisando a los miembros de la especie y/o género objetivo), no contener genes de resistencia a los antibióticos en su genoma, no contener genes que codifiquen para factores de virulencia ni alergenicidad y finalmente, deben seguir estrictamente el ciclo lítico de replicación para la eliminación del huésped bacteriano, liberar la progenie viral y evitar la transducción (Hagens y Loessner, 2010; Culot *et al.*, 2019).

Actualmente, existe en la literatura trabajos sobre el uso de bacteriófagos en insectos, como el de Xu *et al.* (2016), quienes demostraron que al aplicar antibióticos y bacteriofagos vía oral a la chinche *Blissus insularis*, en primer lugar, los antibióticos provocaron un retraso en la eclosión y un tamaño corporal reducido en el insecto, mientras que los bacteriofagos no lograron interactuar con las bacterias simbiotas del intestino debido al propio efecto de estos simbiotas en la estructura del tracto digestivo de la chinche.

Por otro lado, en la investigación de Zhang *et al.* (2021), demostraron que una deficiencia en una bacteria intestinal simbiótica mediada por el uso de bacteriófagos influye directamente en la composición intestinal de las larvas de la mosca doméstica y tiene efectos negativos en el desarrollo del insecto.

De manera local, en la investigación realizada por López-Guerrero (2019), se identificó la biota

bacteriana cultivable de *Aedes aegypti* capturados en la ciudad de Culiacán Sinaloa y se aislaron 12 bacteriófagos (provenientes de agua de dren y de arroyos pluviales), los cuales mostraron fuerte actividad lítica contra 6 de las 22 bacterias aisladas. Las cuales fueron: *Enterobacter xiangfangensis*, *Klebsiella variicola*, *Pantoea deleyi*, *Pantoea dispersa* y *Pantoea stewartii* subsp. indologenes. Su material genético consistió en ADN de doble cadena con un tamaño de genoma entre las 38,764 pb y las 149,428 pb, con un contenido de Guanina-Citosina (G-C) alrededor del 50%. Además, la predicción del ciclo de replicación de los bacteriófagos utilizando el programa PHACTS, sugirió que once de los doce bacteriófagos utilizan el ciclo lítico como estrategia de replicación; el análisis del genoma reveló que no existen genes de codifiquen para factores de resistencia a antibióticos en ninguno de los bacteriófagos y todos son considerados como libres de alérgenos, lo cual representa una característica deseable para su uso. Por último, se observaron tres familias entre los 12 bacteriófagos aislados: *Podoviridae* (F1M1C, F2MIC y F5M1C), *Siphoviridae* (F1M1D, F2M1D, F4MID y F5MID) y *Myoviridae* (F1M1E, F2M1E, F4M1E, F5M1E y F5M2A).

Aunado a lo anterior, la única alternativa natural efectiva para eliminar de manera selectiva a estas especies bacterianas es el uso de bacteriófagos líticos que tengan selectividad por las bacterias que se desean eliminar. Por lo tanto, develar y entender el papel específico que tienen las especies bacterianas en los procesos fisiológicos básicos de los mosquitos puede abrir la frontera del conocimiento para emplear una nueva alternativa de control biológico selectivo a base de formulados de bacteriófagos.

Por lo tanto, se requiere ampliar y dar continuidad a las investigaciones para determinar la capacidad de biocontrol de los fagos contra bacterias presentes en el tracto intestinal de *Aedes aegypti* que promueven los procesos fisiológicos del vector. En este sentido, esta investigación tuvo como objetivo ampliar el cepario de especies bacterianas que habitan el tracto intestinal de *Aedes aegypti* hembra en Culiacán, Sinaloa, así como evaluar bacteriófagos como agentes de biocontrol contra las especies bacterianas aisladas. Esto podría tener un impacto positivo en el desarrollo de una nueva tecnología aplicada para reducir la transmisión de enfermedades por arbovirus como Dengue, Zika y Chikungunya.

### 3. HIPÓTESIS

1. Las especies bacterianas cultivables más predominantes en el tracto digestivo de los mosquitos *Aedes aegypti* de la ciudad de Culiacán, pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Enterobacter*.
2. Se aislará al menos un bacteriófago con actividad lítica contra cada especie bacteriana en estudio y con propiedades aceptables para su aplicación como agente de control biológico
3. La eliminación selectiva de bacterias intestinales de *Aedes aegypti* con bacteriófagos líticos afecta negativamente el desarrollo larval del vector.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Identificar el efecto de la aplicación de bacteriófagos líticos contra bacterias intestinales en larvas de *Aedes aegypti* en su crecimiento y desarrollo como potencial estrategia de biocontrol

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Aislar y caracterizar la biota bacteriana cultivable del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* capturados en la ciudad de Culiacán.
2. Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos contra bacterias aisladas del intestino medio de mosquitos hembra de *Aedes aegypti* capturados en la ciudad de Culiacán.
3. Determinar el tiempo de pupación, mortalidad, proporción sexual y tamaño en larvas de *Aedes aegypti* expuestos a bacteriófagos líticos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Recolección de Mosquitos

Para la captura de mosquitos en su etapa adulta, se utilizó un dispositivo aspirador de mosquitos diseñado y construido previamente (López-Guerrero, 2019). La recolección de los mosquitos silvestres se llevó a cabo en noviembre de 2020 en diferentes puntos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Los criterios de selección de los puntos de toma de muestras fueron los siguientes: lugares frescos, húmedos y oscuros para aumentar las probabilidades de encontrar mosquitos adultos. Los mosquitos fueron capturados mientras se encontraban en reposo o en vuelo y fueron trasladados al laboratorio de conservación de la fauna silvestre en la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) en Ciudad Universitaria.

**Cuadro 1.** Puntos de tomas de muestras para la recolección de mosquitos hembra de *Aedes aegypti*.

Puntos de recolección	Coordenadas
Fraccionamiento Villa Satélite	24°48'21.4"N 107°21'25.6"W
Colonia Nakayama	24°45'05.8"N 107°25'19.2"W
Fraccionamiento Pradera Dorada	24°49'06.4"N 107°25'57.9"W
Colonia Cañadas	24°46'56.4"N 107°24'35.3"W

### 5.2. Identificación Morfológica de *Aedes aegypti*

La identificación de los mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti* se realizó de manera visual, utilizando un microscopio estereoscopio (Leica MDG33, Alemania) y con base en las claves taxonómicas propuestas por Rueda (2004). Esta consistió en distinguir diferencialmente a *Aedes aegypti*, en su etapa adulta de otras especies de mosquitos debido a su coloración oscura y abdomen agudo, anillos blancos en la base de los segmentos tarsales, tibia y fémures de las patas y un patrón de bandas blancas sobre el mesonoto del tórax conocido como diseño de lira invertido. Como en

otras especies de mosquitos, el macho puede distinguirse de la hembra por poseer antenas plumosas y palpos más largos. Los especímenes que no cumplieron con las características taxonómicas de *Aedes aegypti* se descartaron.

### 5.3. Disección de *Aedes aegypti* y Obtención del Intestino Medio

El tubo de plástico conteniendo a los mosquitos fue colocado en un refrigerador a 4 °C durante 5 min, con la finalidad de inmovilizar o contener a los insectos. A su vez, para evitar la contaminación de los mosquitos inmovilizados, estos fueron lavados con alcohol al 70% durante 5 min y se enjuagaron tres veces en buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). Para asegurar la sanitización exterior del mosquito, del último enjuague se tomó una alícuota de 100 µL y se inoculó en medio de cultivo Agar de Soya y Tripticaseina (TSA, siglas en inglés; BIOXON, México) por el método de extensión en placa (se realizó por duplicado), posteriormente se incubó durante 24 h a 36 °C.

Los especímenes fueron transferidos a un portaobjetos montado bajo el estereoscopio (Leica MDG33, Alemania) adicionando una gota de PBS. Se pinchó el tórax del mosquito con un alfiler de disección (000) y suavemente se retiró el abdomen utilizando otro alfiler de disección y se recuperó el intestino medio con el alfiler de disección. Posteriormente, en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se transfirieron 10 intestinos (que conformaron a cada muestra) con 250 µL de PBS estéril y se maceraron por 30 s con un pistilo estéril hasta homogeneizar (Apte-Deshpande *et al.*, 2012). Todo el material que se utilizó para esta prueba se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min y las áreas y equipos de trabajo fueron sanitizadas con etanol al 70%.

### 5.4. Aislamiento e Identificación de la Biota Bacteriana Intestinal de *Aedes aegypti*

#### 5.4.1. Aislamiento de la Biota Bacteriana Cultivable

A partir del homogeneizado de intestinos de mosquitos previamente obtenido, se tomaron 100 µL

y se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ) usando búfer de fosfatos estéril. De cada dilución se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron por duplicado en cajas Petri con TSA, agar MacConkey, agar Sal y Manitol y agar Levine EMB (BIOXON, México) por el método de extensión en placa. Las cajas se incubaron a 37 °C por 48 h.

Después del proceso de incubación, las colonias bacterianas se diferenciaron de acuerdo con sus características de color, tamaño, forma, opacidad, margen, elevación y viscosidad. Una vez identificadas, se tomaron las colonias de manera individual con un asa estéril y transferidas a una nueva placa de Petri con TSA (BIOXON, México). Este procedimiento se realizó varias veces hasta obtener colonias puras (Gusmao *et al.*, 2010). Una vez que la bacteria fue purificada, se realizó la tinción de Gram para una clasificación primaria. Finalmente, las bacterias aisladas y caracterizadas físicamente fueron preservadas en una solución de Glicerol y Caldo de Soya y Tripticaseína (TSB, siglas en inglés; BIOXON, México) y se almacenaron a temperatura de congelación (-80 °C) hasta su identificación (Gusmao *et al.*, 2010).

#### **5.4.2. Extracción de ADN Bacteriano**

Para la extracción del ADN se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias preservadas fueron reactivadas en 5 mL de TSB (BIOXON, México) e incubadas a 37 °C durante 24 a 48 h. El cultivo se centrifugó a 14,000  $\times g$  durante 5 min (Eppendorf mini Spin plus, Alemania), el sobrenadante se desechó y se recuperó el pellet bacteriano. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió con 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis nuclear (Promega, EUA); la suspensión se incubó a 80 °C durante 5 min. Transcurrida la incubación, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de RNAasa y se incubó a 37 °C durante 60 min para degradar cualquier residuo de ARN presente que pudiese interferir con la calidad del ADN extraído. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de precipitación de proteínas, se mezcló en vortex durante 20 s y se incubó en hielo por 5 min, se centrifugaron los tubos a 14,000  $\times g$  durante 3 min. El ADN contenido en el sobrenadante fue recuperado y transferido a otro tubo conteniendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol.

Los tubos se mezclaron gentilmente por inversión hasta que las hebras de ADN formaron una masa visible, la suspensión se centrifugó a 14,000  $\times g$  durante 2 min. Al terminar el ciclo, el sobrenadante fue desechado cuidadosamente y el tubo fue drenado sobre papel absorbente limpio. Posteriormente, se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtieron los tubos varias veces para lavar el pellet de ADN. Las muestras se centrifugaron a 14,000  $\times g$  durante 2 min. El etanol fue aspirado cuidadosamente. Los tubos fueron drenados sobre papel absorbente limpio y el pellet se dejó secar al aire libre por 10-15 min. Finalmente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación de ADN y se incubaron a 65 °C por 1 h.

### 5.4.3. Amplificación del gen rRNA 16S

El material genético extraído fue analizado en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo SCIENTIFIC, EUA) para conocer su concentración y pureza; posteriormente se comprobó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**Cuadro 2.** Verificación de la calidad del ADN bacteriano extraído

Muestra	Concentración de Ac. Nucleicos	Unidad	260/280	260/230	Tipo de muestra
TSA-A1	204.7	ng/ $\mu\text{L}$	1.68	1.1	ADN
TSA-A2	33.6	ng/ $\mu\text{L}$	1.86	4.99	ADN
TSA-B	28.2	ng/ $\mu\text{L}$	1.98	-8.2	ADN
TSA-C(1)	550.4	ng/ $\mu\text{L}$	1.84	1.83	ADN
TSA-C(2)	11.2	ng/ $\mu\text{L}$	1.88	2.62	ADN
TSA-D	499	ng/ $\mu\text{L}$	1.43	0.74	ADN
TSA-E	24.5	ng/ $\mu\text{L}$	1.6	3.41	ADN
TSA-F	9	ng/ $\mu\text{L}$	1.48	-1.59	ADN
TSA-1	29.4	ng/ $\mu\text{L}$	1.65	1.05	ADN
TSA-2	17.2	ng/ $\mu\text{L}$	1.81	1.87	ADN
TSA-4	40	ng/ $\mu\text{L}$	1.59	0.98	ADN
TSA-5	13.2	ng/ $\mu\text{L}$	2.05	0.68	ADN
TSA-6	26.8	ng/ $\mu\text{L}$	1.79	0.98	ADN
TSA-7	36.1	ng/ $\mu\text{L}$	1.54	0.8	ADN
TSA-8	66.6	ng/ $\mu\text{L}$	1.96	1.86	ADN

TSA-9	13.3	ng/μL	1.85	0.92	ADN
TSA-10(1)	52.6	ng/μL	1.8	1.23	ADN
TSA-10(2)	13.9	ng/μL	1.64	0.64	ADN
TSA-11	57.7	ng/μL	1.8	1.48	ADN
TSA-12	55.2	ng/μL	1.91	1.65	ADN
MC-A1	37.9	ng/μL	1.52	0.86	ADN
MC-B1	80.5	ng/μL	1.91	2.14	ADN
MC-A2	61.8	ng/μL	1.93	1.68	ADN
MC-D	422.6	ng/μL	1.62	1.07	ADN
MC-E	73.9	ng/μL	1.89	1.84	ADN
SM-1	43	ng/μL	1.74	1.04	ADN
SM-2	68.1	ng/μL	1.81	1.45	ADN
SM-3	15.3	ng/μL	1.94	1.3	ADN
SM-4	70.6	ng/μL	1.47	0.82	ADN
SM-5	30.3	ng/μL	1.55	1.04	ADN
SM-6	115.8	ng/μL	1.82	1.44	ADN
SM-7	66.7	ng/μL	1.86	2.27	ADN
SM-8	49.8	ng/μL	1.72	2.31	ADN
SM-9	27.9	ng/μL	1.64	0.72	ADN
SM-10	56.2	ng/μL	1.97	2.03	ADN
L-AM	23.1	ng/μL	1.81	3.89	ADN
L-M	40.4	ng/μL	1.72	1.28	ADN
L-B	53.3	ng/μL	1.51	2.64	ADN
L-K	202.4	ng/μL	1.73	1.21	ADN
L-J	35.4	ng/μL	1.77	4.41	ADN
L-I	90.7	ng/μL	1.8	1.43	ADN
L-1	197.3	ng/μL	1.81	1.66	ADN
L-2	113.9	ng/μL	1.53	1.25	ADN
L-3	777.5	ng/μL	1.72	1.53	ADN
L-4	57.5	ng/μL	1.84	1.78	ADN
L-5	26.2	ng/μL	1.63	0.86	ADN
L-6	150.1	ng/μL	1.61	1.44	ADN
L-7	1298.5	ng/μL	1.83	1.49	ADN
L-8	921.9	ng/μL	1.77	1.3	ADN
L-9	98	ng/μL	1.78	1.99	ADN

Una vez que se comprobó que el material genético era de buena calidad en términos de una relación  $260/280 > 1.7$  (AND/proteínas), además de que se comprobó la integridad del ADN mediante electroforesis, se realizó la amplificación del rRNA 16S por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). Para ello, se utilizó el kit Gotaq PCR core system 1 (Promega, EUA; M7660 numero de catálogo), siguiendo la metodología empleada por Gusmao *et al.* (2010) con

algunas modificaciones. Se utilizaron los primers universales 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T – 3') y 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG – 3'). Para la mezcla de reacción se agregó ADN templado (100 ng); primer 27F (6 µM); primer 1492 (6 µM); MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM); BUFFER de reacción (1X); DNTP's mix (200 µM cada uno); Taq DNA polimerasa (1 U) y agua ultra pura estéril suficiente para una reacción de 25 µL. Las condiciones para la amplificación por PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; seguido de 35 ciclos que incluyó una desnaturalización a 95 °C por 35 s, un alineamiento de los primers a 56 °C durante 35 s y una extensión a 72 °C durante 90 s; por último, un paso final de 10 min a 72 °C. La amplificación generó un producto de aproximadamente 1,500 pb.

La calidad y concentración de los amplicones se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras amplificadas fueron secuenciadas en la empresa MacroGen ubicada en Corea del Sur y la identificación bacteriana se realizó mediante alineamiento local básico de secuencias ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool \(nih.gov\)](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)), utilizando como criterio de homología e identidad un porcentaje de similitud mayor del 90%.

## 5.5. Aislamiento de Bacteriófagos Líticos Contra Bacterias de la Biota Intestinal de *Aedes aegypti*

### 5.5.1. Toma de Muestras

Las muestras de intestinos medios que se utilizaron previamente para el aislamiento e identificación de la biota bacteriana cultivable se conservó a -20 °C hasta que se usaron para el aislamiento de los bacteriófagos.

### 5.5.2. Enriquecimiento

Las bacterias aisladas y preservadas en la etapa anterior fueron reactivadas de manera individual

por el método de estriado en placas con TSA (BIOXON, México). Posteriormente se tomó una colonia de cada bacteria y de manera individual se cultivaron en TSB (BIOXON, México) y se incubaron por 24 h a 37 °C. Enseguida, de los cultivos anteriores se mezcló 1 mL de cada bacteria en tubos estériles de 50 mL (para hacer un pool de bacterias) los cuales fueron inoculados con las muestras de intestinos medios de *Aedes aegypti* e incubados en condiciones aerobias a 37 °C durante 18-24 h. Transcurrida la incubación, los tubos se agitaron en vortex y se centrifugaron a 13,800 *xg* por 10 min a 4 °C; se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ ; a este filtrado se le denominó “Lisado de fagos”.

### **5.5.3. Determinación de Bacteriófagos por la Prueba de “Spot”**

Para evidenciar la presencia de bacteriófagos líticos contra las bacterias en estudio, se realizó la prueba de goteo (Spot) mediante la técnica de la doble capa de agar con los lisados de cada muestra. Para ello, se mezcló 1 mL de bacteria en fase de crecimiento exponencial en un tubo que contenía 3 mL de TSB-Agarosa 0.4% (p/v) precalentado y licuado a 45 °C y se vertió el contenido sobre cajas Petri con TSA (BIOXON, México). Estas se dejaron solidificar y finalmente se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de cada lisado sobre la capa de agar suave; una vez que la gota se secó, las cajas se invirtieron y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h (Este procedimiento se repitió para cada una de las bacterias en estudio y cada lisado donde se suponía la presencia de bacteriófagos). La presencia de una placa de lisis o “calva” en donde se colocó la gota, indicó la presencia de bacteriófagos líticos contra esa bacteria (Clokie y Kropinski, 2009).

### **5.5.4. Purificación de Bacteriófagos**

Una vez que se confirmó la presencia de bacteriófagos en los lisados, fue necesario aislarlos y purificarlos, para esto, se utilizó la técnica de doble capa de agar convencional. Las cepas bacterianas que demostraron susceptibilidad ante los bacteriófagos presuntivos, fueron cultivadas

de manera individual en TSB (BIOXON, México) por 24 h a 37 °C. Enseguida, se mezcló 1 mL de bacteria y 100 µL del lisado que contenía los bacteriófagos, en un tubo que contenía 3 mL de TSB-Agarosa 0.4% (p/v) precalentado y licuado a 45 °C; se homogeneizó la mezcla y se vertió sobre cajas Petri con TSA (BIOXON, México), se dejaron secar y se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Transcurrido el tiempo, se seleccionaron placas con base a su tamaño y claridad, y fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenía 1 mL de buffer de fosfatos estéril. El procedimiento de doble agar y recuperación de placas individuales se repitió cuatro veces para obtener fagos únicos y purificados (Clokic y Kropinski, 2009).

## 5.6. Ensayos de Aplicación de Bacterias y Bacteriófagos en Larvas Gnobióticas de *Aedes aegypti*

### 5.6.1. Cría de Mosquitos

Para la realización de esta actividad se utilizó la cepa Rockefeller (ROCK) de *Aedes aegypti* y fue mantenida en una solución de azúcar al 10% a 27-30 °C y a una humedad relativa de 70%, con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Algodón estéril, papel filtro y redes esterilizadas fueron utilizadas para mantener al máximo la esterilidad de las jaulas (SPPS, 2015).

La alimentación de larvas procedió de acuerdo con lo establecido por Coon *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Brevemente, las larvas se alimentaron con una dieta estándar que consiste en comida para conejos (conejina) en frascos de plástico, los cuales contenían agua destilada estéril producida en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidad Culiacán. Posteriormente, las pupas fueron transferidas a jaulas de plástico en donde emergieron adultos y éstos recibieron 10% de sacarosa en agua *ad libitum* (a voluntad). Los mosquitos hembra fueron alimentados dos días con sangre de conejo después de emerger (previamente inmovilizado). Pasadas 36 h comenzó el proceso de oviposición. Los huevos fueron almacenados en recipientes a temperatura ambiente hasta su uso.

### 5.6.2 Cultivo de Bacterias

Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L de las bacterias *Klebsiella variicola* y *Enterobacter xiangfangensis* que están preservadas en el cepario del LANIIA y se sembraron en 10 mL de TSB (BIOXON, México) e incubadas en agitación toda la noche a 36 °C. Antes de inocular las larvas axénicas, los cultivos bacterianos se lavaron con buffer de fosfatos estéril (PBS, pH 7.4) siguiendo la metodología propuesta por Pan (2019). Brevemente, el cultivo bacteriano se centrifugó por 10 minutos a 7,300  $\times g$  a 4 °C . Posteriormente, se desechó el sobrenadante y al pellet bacteriano se le añadieron 10 mL de PBS y se resuspendieron las células bacterianas por agitación en vórtex. Este procedimiento se repitió dos veces adicionales.

### 5.6.3. Producción de Larvas Gnotobióticas

Se produjeron larvas axénicas colocando huevos obtenidos en el paso anterior sobre placas Petri estériles, las cuales se adicionaron con alcohol etílico al 70%, durante 5 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces en buffer de fosfatos estéril (PBS, pH 7.4). Una vez esterilizados, se colocaron en tubos Corning de 50 mL con 20 mL de agua estéril y 100  $\mu$ L de alimento estéril (conejina a una concentración de 3.3 mg/100  $\mu$ L de agua destilada). Pasadas 48 h, eclosionaron los primeros estadios larvales. Las larvas gnotobióticas se produjeron seleccionando una colonia de dos o más aislados bacterianos de *Klebsiella variicola* y *Enterobacter xiangfangensis* y se inocularon al cultivo de larvas axénicas. Los cultivos de larvas gnotobióticas fueron criadas hasta la pupación adicionando una nueva dieta estándar esterilizada cada día (Coon *et al.*, 2014). Finalmente, se recolectaron las pupas, se lavaron con agua esterilizada y se realizaron las mediciones correspondientes.

#### 5.6.4 Propagación de Bacteriófagos

Para la propagación de los bacteriófagos se utilizó la metodología propuesta por Carey-Smith *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Brevemente, se mezcló 1 mL de la cepa hospedadora en su fase de crecimiento exponencial con 100  $\mu$ L del bacteriófago purificado, en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de TSB-Agarosa 0.4% (p/v) licuado a 45 °C; el contenido se vertió en cajas de Petri con TSA (BIOXON, México) y se dejaron solidificar. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Una vez desarrolladas las placas (replicación de los bacteriófagos), se agregaron 6 mL de búfer de fosfatos estéril a cada caja Petri y se recuperó la capa suave utilizando un raspador de células estéril, el eluido final se centrifugó a 8,500  $xg$  durante 10 min a 4 °C para eliminar células bacterianas y residuos del medio de cultivo. El sobrenadante fue filtrado por membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m de diámetro. El filtrado se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

#### 5.6.5 Concentración y Titulación de Bacteriófagos

Para la concentración y titulación del fago, se tomaron 40 mL del bacteriófago propagado en el paso anterior y se centrifugó a 40,000  $xg$  durante 2 h. El sobrenadante fue decantado y el sedimento se resuspendió en 10 mL de búfer de fosfatos estéril y finalmente se filtró a través de un acrodisco de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m de diámetro. El título de los bacteriófagos se determinó mediante el método propuesto por Clokie y Kropinski (2009). Brevemente, se prepararon diluciones decimales seriadas en búfer de fosfatos estéril ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) del bacteriófago concentrado y se realizó la técnica de la doble capa de agar. Finalmente, fueron seleccionadas las diluciones en donde se pudo contar entre 30 y 300 placas por la técnica del doble agar y se calculó la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = \text{Número de placas} \times 10 \times \text{Recíproco de la dilución contada} \quad (1)$$

#### 5.6.4. Ensayos de Control Biológico de Fagos-Bacterias en Larvas de *Aedes aegypti*

Debido a que no fue posible el aislamiento de bacteriófagos líticos en el presente estudio, se tomaron bacteriófagos y bacterias obtenidas previamente por López-Guerrero (2019) del grupo de investigación de LANIIA; los bacteriófagos fueron aislados del medio ambiente y se comprobó mediante análisis informático que no tuvieran genes de resistencia a antibióticos, genes de alérgenos y genes de virulencia. Se prepararon tres tratamientos con treinta larvas gnotobióticas del tercer estadio cada uno. Se inocularon dos grupos con los bacteriófagos específicos (el fago F4MIE para *Enterobacter xiangfangensis* y el fago F4MID para *Klebsiella variicola*) para cada especie bacteriana inoculada en las larvas gnotobióticas y se dejó un grupo sin inocular como control. Los tratamientos fueron “larvas gnotobióticas” (LB), “larvas gnotobióticas infectadas con fagos” (LBF), “larvas axénicas infectadas con fagos” (LF) y un grupo control (larvas axénicas). Para el tratamiento con larvas axénicas infectadas con fagos, se añadió la suspensión del fago purificado a una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFP/mL en TBS a 5 mL de agua estéril con 100  $\mu$ L de dieta estándar esterilizada (conejina). Para el tratamiento con larvas gnotobióticas, se añadieron las bacterias cultivadas en caldo nutritivo a una concentración final de  $1 \times 10^9$  UFC/mL a 5 mL de agua estéril con 100  $\mu$ L de alimento. Para el tratamiento con larvas gnotobióticas infectadas con fagos, se añadieron al alimento tanto la suspensión de fagos purificada ( $1 \times 10^6$  UFP/mL) como las bacterias cultivadas en caldo nutritivo ( $1 \times 10^9$  UFC/mL). Larvas del tercer estadio se expusieron a cada tratamiento hasta alcanzar la etapa de pupa. Se mantuvo la dieta estándar estéril durante todo el experimento (Xu *et al.*, 2016).

#### 5.6.5. Análisis Estadísticos

El diseño experimental consistió en un diseño de un solo factor (Bacteria), con 2 niveles (B1, B2) y a cada grupo de 30 larvas de tercer estadio ( $5-7 \pm 1$  mm) se les aplicaron tres tratamientos (1.- Larvas gnotobióticas, 2.- larvas gnotobióticas infectadas con fagos y 3.- larvas axénicas infectadas con fagos) hasta alcanzar la etapa de pupa con dos replicas. Al finalizar el experimento se midieron

las variables de respuesta “mortalidad”, “proporción sexual”, “tamaño de la pupa” y “tiempo de pupación”, y los datos se recopilaron en el software SPSS, en donde se realizó un ANOVA con la prueba de Tukey y con un nivel de significancia del 95%. Un estimador no paramétrico Kaplan Meier fue usado para el análisis de la supervivencia de las larvas desde el tercer estadio hasta su pupación bajo las condiciones de experimentación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento e Identificación de la Biota Bacteriana Intestinal de *Aedes aegypti*

Se obtuvieron 51 aislados bacterianos, de los cuales, el grupo de mayor prevalencia está representado por bacilos Gram positivos (22 aislados), seguido de cocos Gram positivos (12 aislados), bacilos Gram negativos (10 aislados) y finalmente, en menor proporción, cocos Gram negativos (7 aislados).

Los aislados bacterianos que se seleccionaron para identificación a nivel de género y especie se sometieron posteriormente al análisis de secuencias del rRNA 16S, esto mediante el programa de alineamiento básico local del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, siglas en inglés) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en donde se identificaron los siguientes géneros bacterianos: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bhargavaea*, *Priestia*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Salinicoccus*, *Cronobacter* y *Olivibacter*. (Cuadro 3). *Bacillus* spp. (16) fue el género predominante en la mayoría de los aislados, seguido de los géneros *Staphylococcus* (2), *Micrococcus* (2) y *Arthrobacter* (2). En total se obtuvo una diversidad de 31 especies bacterianas pertenecientes a 13 géneros.

**Cuadro 3.** Identificación de las bacterias aisladas del intestino medio de *Aedes aegypti* basados en la secuenciación del gen rRNA 16S.

Aislado	Morfología y tinción de Gram	Identificación	% de similitud
TSA-A1	Bacilo G+	<i>Bacillus velezensis</i>	99.79
TSA-A2	Bacilo G+	<i>Bacillus subtilis</i>	92.44
TSA-B	Bacilo G-	<i>Bacillus subterraneus</i>	99.71
TSA-C(1)	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99.91
TSA-C(2)	Coco G+	<i>Micrococcus luteus</i>	99.66
TSA-D	Bacilo G+	<i>Bacillus firmus</i>	99.9
TSA-E	Bacilo G+	<i>Bhargavaea cecembensis</i>	99.9
TSA-F	Bacilo G+	<i>Bacillus foraminis</i>	99.64
TSA-1	Coco G+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.81
TSA-2	Bacilo G+	<i>Bacillus endophyticus</i>	99.4

<b>TSA-4</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Stercoris</i>	99.61
<b>TSA-5</b>	Coco G+	<i>Arthrobacter pascens</i>	99.9
<b>TSA-6</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
<b>TSA-7</b>	Bacilo G+	<i>Priestia megaterium</i>	99.91
<b>TSA-8</b>	Coco G+	<i>Kocuria flava</i>	99.9
<b>TSA-9</b>	Coco G-	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99.15
<b>TSA-10(1)</b>	Bacilo G+	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i>	99.8
<b>TSA-10(2)</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.63
<b>TSA-11</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99.9
<b>TSA-12</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>MC-A1</b>	Coco G+	<i>Micrococcus endophyticus</i>	100
<b>MC-B1</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9
<b>MC-A2</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.81
<b>MC-D</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
<b>MC-E</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>SM-1</b>	Coco G+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.69
<b>SM-2</b>	Coco G+	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99.81
<b>SM-3</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	100
<b>SM-4</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus marisflavi</i>	99.79
<b>SM-5</b>	Coco G+	<i>Salinicoccus roseus</i>	99.48
<b>SM-6</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus megaterium</i>	99.9
<b>SM-7</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus paramycooides</i>	99.68
<b>SM-8</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.81
<b>SM-9</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6
<b>SM-10</b>	Coco G+	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99.81
<b>L-AM</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>L-M</b>	Bacilo G-	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99.41
<b>L-B</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>L-K</b>	Bacilo G-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95.21
<b>L-J</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus megaterium</i>	99.81
<b>L-I</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.44
<b>L-1</b>	Bacilo G-	<i>Olivibacter jilunii</i>	99.25
<b>L-2</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>L-3</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<b>L-4</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus megaterium</i>	99.61
<b>L-5</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus megaterium</i>	100
<b>L-6</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	88.94
<b>L-7</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99.79
<b>L-8</b>	Bacilo G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.38
<b>L-9</b>	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98.41
TSA: Agar de soya y tripticaceina L: Levine EMB SM: Sal y manitol MC: Mac Conkey	G+: Gram positiva G-: Gram negativa	% de similitud: similitud de las secuencias con las de la base de datos NCBI	

Todos los géneros bacterianos aislados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (plantas, agua, o como biota normal de la piel de los humanos). Investigaciones proponen que los mosquitos pueden adquirir su biota bacteriana intestinal de forma vertical, es decir, heredadas de sus madres, o de forma horizontal al adquirirlas directamente de la naturaleza, principalmente de los sitios en donde se alimentan (Coon *et al.*, 2014).

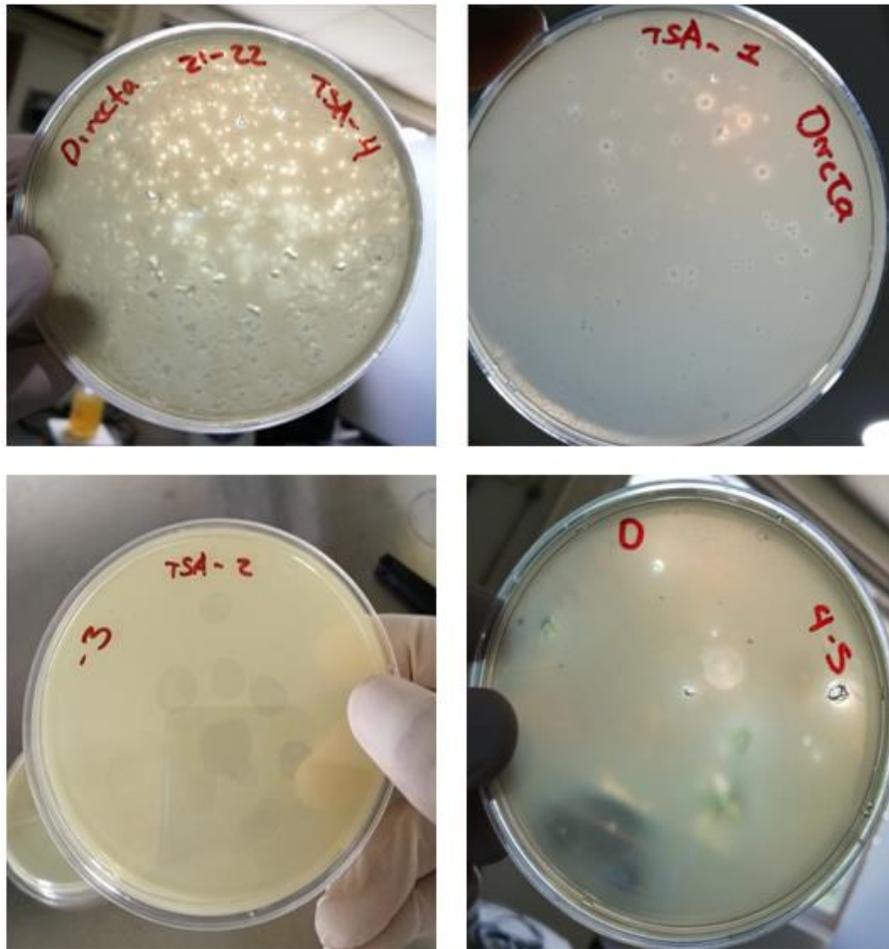
Los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* y *Micrococcus* han sido aislados consistentemente tanto de mosquitos *Aedes aegypti* como de otras especies de mosquitos. Esto ha permitido a diversos investigadores inferir que estos géneros bacterianos son capaces de mantener una asociación estable con su insecto hospedero y que posiblemente desempeñan algún rol importante en la vida del mosquito, lo que las convierte en bacteria objetivo para futuros ensayos (Gusmão *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012; López-Guerrero, 2019).

En el presente estudio se identificó la presencia de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus arlettae*. Llama la atención que este género ha sido aislado previamente de *Aedes aegypti* en la ciudad de Culiacán Sinaloa, en el periodo de muestreo mayo-agosto de 2018 (López-Guerrero, 2019), mientras que el presente estudio fue llevado a cabo entre noviembre – diciembre de 2021, lo cual permite sugerir que *Staphylococcus* forma parte importante de la biota intestinal de *Aedes aegypti*, dada su presencia tanto en periodo de verano como de otoño. Se ha reportado que estas bacterias son integrantes de la microbiota de la piel, por lo que podría considerarse que su origen. Una de las características más importante de este género es que son productores de hemolisina, por lo tanto, se podría inferir que al igual que las especies de *Serratia*, estas bacterias están relacionadas con el proceso de digestión de la sangre, y, por consiguiente, en la producción de huevos en *Aedes aegypti* (Gaio *et al.*, 2011).

## 6.2. Aislamiento de Bacteriófagos contra Bacterias de la Biota Intestinal de *Aedes aegypti*

En el presente estudio se planteó aislar bacteriófagos del intestino medio de *Aedes aegypti* los cuales presentarían actividad estrictamente lítica contra algunas de las bacterias identificadas. Sin embargo, no se lograron aislar.

El aislamiento de bacteriófagos inició el mes de junio del 2021 con las muestras del intestino medio de adultos hembra de *Aedes aegypti*, las primeras semanas fueron de pruebas de spot y aislamiento; sin embargo, no hubo éxito en la obtención de placas de lisis. Se continuó con el aislamiento por un periodo de seis meses (Cuadro 4). En estos meses, hubo seis ocasiones en las que se observó inhibición por lo que se continuó con el aislamiento y purificación.



**Figura 7.** Obtención de calvas.

Al inicio de la etapa experimental, se utilizaron las muestras de intestinos medios de adultos hembra de *Aedes aegypti* almacenados previamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la prueba de spot. En ambos meses en los que se realizó esta técnica (Junio y Julio), arrojaron datos positivos, ya que se obtuvieron calvas en los ensayos, por lo que se continuó con el aislamiento y purificación. De todos los aislados, sólo

en algunos de ellos se apreció la lisis de la placa de agar suave (figura 7). Posterior a la purificación, se siguieron observando calvas; sin embargo, a partir de la segunda repetición de purificación, dejaron de identificarse placas de lisis. Por ello, se repitió el proceso de la prueba de spot y aislamiento, no obstante ésta ocurrió sin éxito. En los meses posteriores, se utilizaron muestras de larvas y mosquitos adultos macerados completos, pero se obtuvieron resultados similares durante los siguientes meses, noviembre-enero (**Cuadro 4**) y no se logró la obtención de bacteriófagos purificados.

**Cuadro 4.** Cronograma de toma de muestras durante el aislamiento de bacteriófagos.

Mes	Prueba de spot	Aislamiento	Purificación
<b>Junio 2021</b>	X	X	X
<b>Julio 2021</b>	X	X	X
<b>Octubre 2021</b>	X	X	-
<b>Noviembre 2021</b>	X	-	-
<b>Noviembre 2021</b>	X	-	-
<b>Diciembre 2021</b>	X	-	-
<b>Enero 2022</b>	X	-	-
<b>Enero 2022</b>	X	-	-

Se seleccionaron las bacterias *Enterobacter xiangfangensis* (MIE) y *Klebsiella variicola* (MID) ya que también se aislaron bacteriófagos líticos contra estas bacterias.

### 6.3. Ensayos de Control Biológico de Fagos-Bacterias en Larvas de *Aedes aegypti*

Para evaluar el efecto de las bacterias y los bacteriófagos en larvas de *Aedes aegypti* en los experimentos desarrollados, se monitoreó su desarrollo larval diariamente hasta que alcanzaron la etapa de pupa. Larvas del tercer estadio fueron expuestas a tres tratamientos por cada bacteria en estudio (*Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*), los cuales consistieron en: larvas gnotobióticas (LB), larvas gnotobióticas infectadas con fagos (LBF) y larvas axénicas infectadas

con fagos (LF). Como se puede observar en la figura 8, hubo diferencias significativas entre las bacterias en estudio ( $p=0.00$ ). Los datos analizados representan las larvas que llegaron a pupa y las larvas que murieron (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Estado de las larvas de *Aedes aegypti* al final del experimento

Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	Cantidad	%
Alcanzaron etapa de pupa	256	71.11
Murieron	104	28.89
Total	360	100

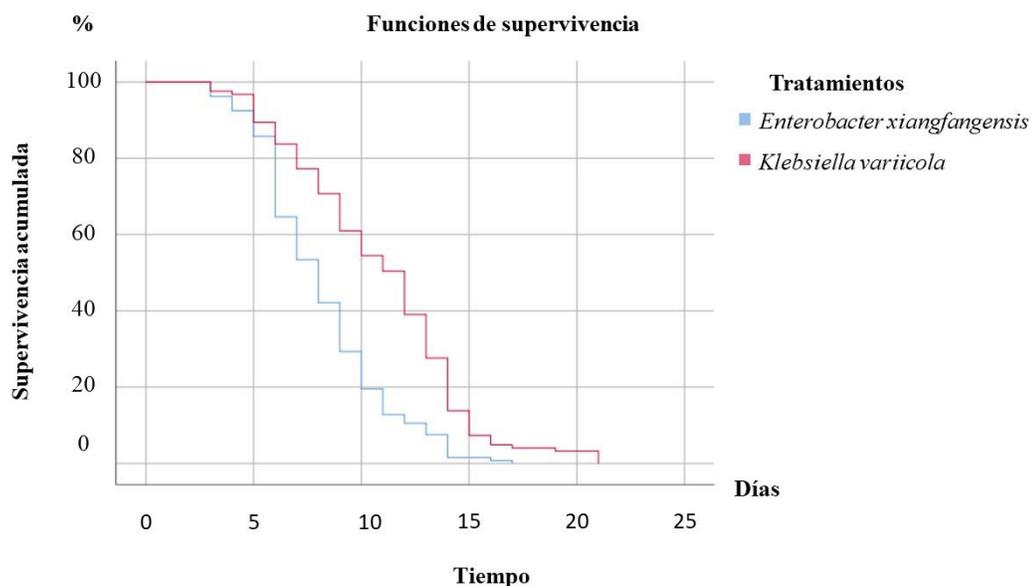
### 6.3.1. Efecto de *Enterobacter xiangfangensis* en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti*

Los grupos de larvas expuestos a *Enterobacter xiangfangensis* (B1) presentaron un tiempo de pupación promedio y máximo de 7.36 y 16 días, respectivamente (figura 9).

Al comparar estos resultados con el tiempo que tardan las larvas de *Aedes aegypti* en llegar a la etapa de pupación en condiciones naturales (de 4 a 5 días apartir de larvas del primer estadio), se observó que la aplicación de *Enterobacter xiangfangensis* en larvas de *Aedes aegypti*, provoca tiempos de pupación más prolongados durante la etapa larva-pupa, ya que tuvo un tiempo de pupación de 7 días apartir del tercer estadio. De tal manera que, si se tomara en cuenta el tiempo que tardaron las larvas en llegar al tercer estadio (3 a 4 días) en el presente estudio, el tiempo total de pupación sería aproximadamente 10-11 días. En otras palabras, el tiempo que tardaron las larvas de *Aedes aegypti* en llegar a la etapa de pupación al ser inoculadas con *Enterobacter xiangfangensis* fue de 6 días más que lo reportado en la literatura (Biogents Mosquito Control, 2018). Este tiempo prolongado durante la etapa larva-pupa puede afectar el crecimiento (desarrollo lento = mosquitos más grandes) y capacidad vectorial (tasa de picadura meno y menor probabilidad de infectarse con arbovirus) del mosquito.

Por otro lado, aislados de *Enterobacter* spp. ya han sido expuestas a larvas de *Aedes aegypti*, con

resultados contrarios a esta investigación. Pan (2019), al experimentar con larvas gnotobioticas de *Aedes aegypti* del primer estadio expuestas a tratamientos con bacterias y bacteriófagos, demostró que *E.coli* y *Enterobacter* spp. tuvieron los índices de pupación más rápidos (5.65 y 6.08 días, respectivamente). Esta diferencia puede deberse a que se inocularon las bacterias en larvas del primer estadio, además, no se mencionó cuál fue la especie de *Enterobacter* que se inoculó en los tratamientos. Las diferencias encontradas en ambas investigaciones podrían deberse a múltiples factores, incluyendo las condiciones experimentales, a las bacterias y bacteriófagos evaluados, concentración bacteriana, entre otros. Es por ello que se requiere profundizar en estudios enfocados en los efectos que ocasiona la aplicación de bacteriófagos contra especies bacterianas específicas en el desarrollo larval de *Aedes aegypti*.



**Figura 8.** Funciones de supervivencia entre bacterias. Larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio inoculadas con *Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*. Los grupos fueron revisados diariamente hasta su pupación (n=256). Se utilizó un estimador no paramétrico Kaplan Meier para el análisis de la supervivencia con dos replicas.

### 6.3.2. Efecto de *Klebsiella variicola* en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti*

Los grupos de larvas expuestas a *Klebsiella variicola* (B2) presentaron un tiempo de pupación

promedio de 10.84 y un tiempo máximo de 21 días (figura 7). Estos resultados se asemejan a lo encontrado por Pan (2019), ya que demostró que *Serratia* spp. y *Arthrobacter* spp. tuvieron los índices de pupación más lentos, al igual que *Klebsiella variicola* en nuestro estudio. Por consiguiente, *Serratia* spp, *Arthrobacter* spp y *Klebsiella variicola* prolongan el tiempo de pupación de las larvas de *Aedes aegypti*; ya sea que se inoculen en larvas del primer estadio como del tercero.

Estos datos sugieren que algunas bacterias simbiotes de *Aedes aegypti* tienen un efecto en el desarrollo del vector durante su etapa larval, prolongando su tiempo de pupación. Para fines de control biológico del vector, los resultados del presente estudio plantean un escenario favorable, ya que un desarrollo prolongado significa tener un mayor margen de tiempo para la aplicación de otras estrategias para su control, aumenta la probabilidad que los recipientes con agua en los que se encuentran los mosquitos se sequen o se descarguen antes de la emergencia y también les da más oportunidad de actuar a los depredadores del vector.

### **6.3.3. Efecto del Bacteriófago F4MIE en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos de larvas expuestos solamente al bacteriófago F4MIE (LF) presentaron un tiempo de pupación promedio de 8.39 días y un tiempo máximo de pupación de 17 días (figura 9). Lo interesante de estos resultados es que la sólo aplicación del bacteriófago logró rescatar el desarrollo de los grupos de larvas de *Aedes aegypti* y les permitió llegar a la etapa de pupa. Hasta el momento no hay información relacionada con el desarrollo de larvas expuestas únicamente a bacteriófagos, pero sí expuestas a bacterias y a ambientes estériles. De esta forma, se ha demostrado que al producir larvas en un ambiente estéril, estas mueren, y al exponerlas a una cepa bacteriana alcanzan la etapa de pupa (Coon *et al.*, 2016a; Coon *et al.*, 2016b; Pan 2019). Además, estos resultados sugieren que el bacteriófago fue capaz de adentrarse en el tracto digestivo de la larva, aunque no se haya confirmado. Se ha reportado que en algunos insectos, los bacteriófagos no logran impactar a la bacteria objetivo, gracias a un bloqueo entre la conexión del intestino anterior y posterior (Xu *et al.*, 2016).

#### **6.3.4. Efecto del Bacteriófago F4MID en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos de larvas expuestos solamente al bacteriófago F4MID (LF) presentaron un tiempo de pupación promedio de 10.15 días y un tiempo máximo de pupación de 14 días (figura 10).

Estos datos resultan interesantes porque hasta el momento se desconoce el papel fundamental de los fagos en el tracto intestinal de mosquitos y su potencial efecto en los procesos fisiológicos del vector al aplicarlos intencionalmente. El único trabajo relacionado en bioensayos con larvas de *Aedes aegypti* expuestas a bacteriófagos y bacterias intestinales es el de Pan (2019); sin embargo, en esta investigación no se aplicaron bacteriófagos solos en larvas, sino bacterias y bacterias infectadas con fagos. De esta forma, en nuestra investigación, al igual que los tratamientos con las bacterias, el tratamiento de larvas axénicas infectadas sólo con bacteriófagos prolongó el tiempo de pupación de larvas de *Aedes aegypti*. Por lo tanto, la aplicación de sólo los bacteriófagos F4MIE y F4MID en larvas del tercer estadio, tuvieron un efecto en el desarrollo del vector, al prolongar su tiempo de pupación con una media y tiempo máximo de pupación de 8.39 y 17 días, respectivamente.

#### **6.3.5. Efecto de *Enterobacter xiangfangensis* Infectada con el Bacteriófago F4MIE en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos de larvas expuestos a *Enterobacter xiangfangensis* infectada con el fago F4MIE (LBF) presentaron un tiempo de pupación promedio de 8.69 días y un tiempo de pupación máximo de 14 días. Como se puede observar en la figura 9, las larvas expuestas al tratamiento LBF se desarrollaron más lento que las expuestas al resto de tratamientos (LB:7.36 días y LF:8.39 días), ya que muy pocas larvas emergieron como pupas en los primeros días. Cada caída en la supervivencia representó una o más larvas que llegaron a pupa o que murieron durante el experimento (cuadro 5). De tal manera que, el desarrollo larva-pupa se mantuvo lento los primeros 7 días; es decir, muy pocas larvas llegaban a pupa en un mismo día. Posterior al día 8, un mayor

numero de larvas alcanzaron la etapa de pupa en un mismo día y así fue evolucionando el resto de los días, hasta que llegó a un punto donde las larvas dejaron de alcanzar la etapa de pupa o simplemente murieron.

### **6.3.6. Efecto de *Klebsiella variicola* Infectada con el Bacteriófago F4MID en el Tiempo de Pupación en Larvas de *Aedes aegypti***

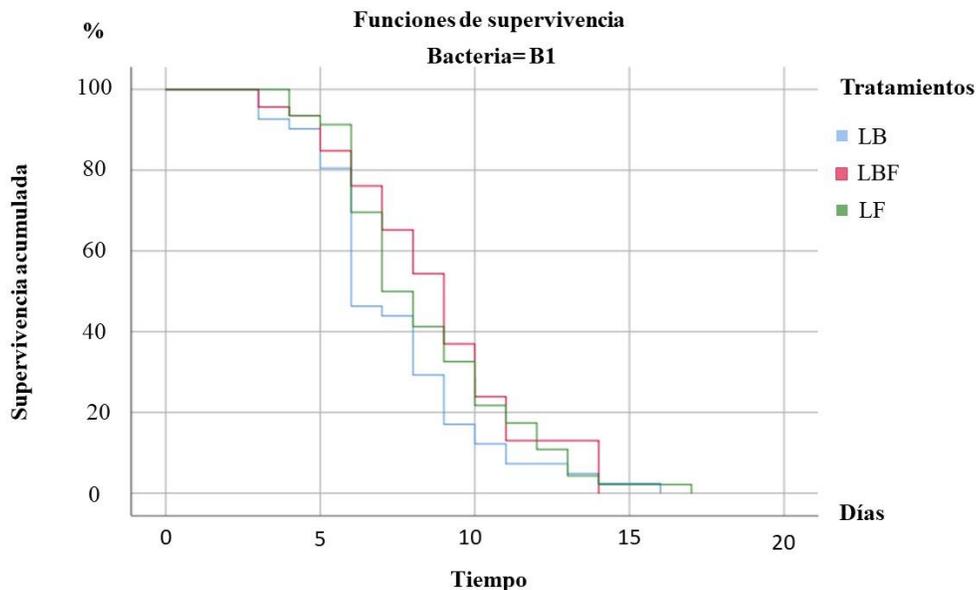
Los grupos de larvas expuestos a *Klebsiella variicola* infectada con el fago F4MID (LBF) presentaron un tiempo de pupación promedio de 11.59 días y un tiempo pupación máximo de 16 días (figura 7).

Con base en lo anterior, se observó que la aplicación de *Klebsiella variicola* infectada con el bacteriófagos F4MID en larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*, prolongó el tiempo que tardan las larvas en llegar a la etapa de pupa. Por lo tanto, el tratamiento LBF tuvo un efecto en el desarrollo del vector durante la etapa larva-pupa al prolongar el tiempo de pupación de las larvas con una media de 11.59 días y un tiempo pupación máximo de hasta 16 días.

### **6.3.7. Efecto de *Enterobacter xiangfangensis* en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos de larvas del tercer estadio expuestos únicamente a *Enterobacter xiangfangensis* (B1) tuvieron una probabilidad de sobrevivir 5 días del 0.80; es decir, el 80% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. La probabilidad de sobrevivir en los días porterioros bajó considerablemente, ya que, para el día 6, la probabilidad de sobrevivir fue de 0.45 (45% de supervivencia). Se presentó una reducción del 35% en la supervivencia de las larvas del día 5 al 6. La probabilidad de sobrevivir prácticamente se mantuvo constante entre los días 6 y 7, y sólo bajó a 42.5% de supervivencia. La probabilidad de sobrevivir bajó de 42.5 a 30% para el día 8. Para el día 9, solo el 17.5% de las larvas sobrevivieron. La probabilidad de sobrevivir por más de 10 días se mantuvo por debajo de

0.10 ya que para el día 11, solo el 7.5% de las larvas sobrevivieron. Por lo tanto, *Enterobacter xiangfangensis* mantuvo una densidad alta de larvas vivas sólo por 5 días (>80% de supervivencia) y una densidad baja del día 6 al 16 (<45% de supervivencia). No sobrevivió ninguna larva más de 16 días (figura 9).

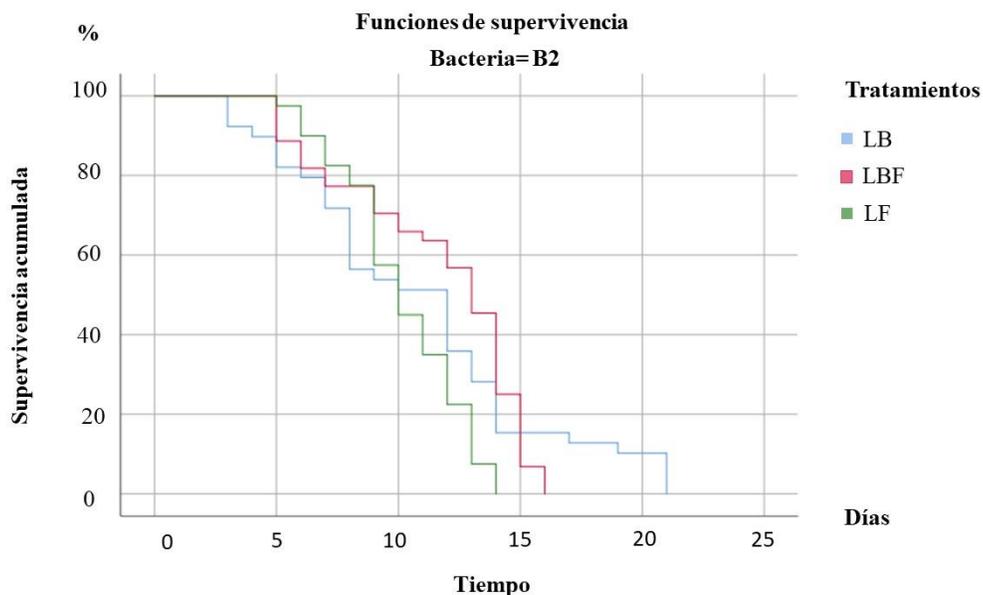


**Figura 9.** Funciones de supervivencia de *Enterobacter xiangfangensis*. Larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio inoculadas con *Enterobacter xiangfangensis* (LB), *Enterobacter xiangfangensis* infectada con fagos (LBF) y bacteriófagos líticos (LF). Los grupos fueron revisados diariamente hasta que todas las larvas puparon (n=135). Un estimador no paramétrico Kaplan Meier fue usado para el análisis de supervivencia con dos replicas.

### 6.3.8. Efecto de *Klebsiella variicola* en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti*

Los grupos de larvas de *A. aegypti* expuestos a *Klebsiella variicola* (B2) tuvieron una probabilidad de sobrevivir 5 días de 0.82; es decir, el 82% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. 24 h después, la probabilidad de sobrevivir 6 días bajó solo un 2%. Del día 5 al 7, se observó que la probabilidad de sobrevivir se mantuvo por arriba del 0.75. Esta probabilidad empezó a disminuir después del día 8, dicha disminución fue mínima, ya que, para el día 9 sobrevivió más del 52% de las larvas. La supervivencia se mantuvo superior a 50% 48 h más. Es decir, la mitad de las larvas

lograron sobrevivir más de 11 días al ser expuestas a *Klebsiella variicola*. A la par, la probabilidad de sobrevivir 16 días disminuyó a 0.15 (15% de supervivencia). Por último, el 10% de las larvas sobrevivieron al menos 21 días y ninguna larva sobrevivió más de 21 días. Por lo tanto, *Klebsiella variicola* mantuvo una densidad alta de larvas vivas por 7 días (>80% de supervivencia) y una densidad baja del día 12 al 21 (<45% de supervivencia). En otras palabras, las larvas de *Aedes aegypti* expuestas a *Klebsiella variicola* tuvieron una supervivencia alta gran parte del tiempo en el que se desarrollaron los experimentos (figura 10). La diferencia entre ambas bacterias es muy notoria ya que de las larvas expuestas a *Enterobacter xiangfangensis*, sólo el 17.5% sobrevivieron por más de 9 días, mientras que de las expuestas a *Klebsiella variicola* el 52% de estas sobrevivieron la misma cantidad de días.



**Figura 10.** Funciones de supervivencia de *Klebsiella variicola*. Larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio inoculadas con *Klebsiella variicola* (LB), *Klebsiella variicola* infectada con bacteriófagos (LBF) y bacteriófagos líticos (LF). Los grupos fueron revisados diariamente hasta que todas las larvas puparon (n=121). Un estimador no paramétrico Kaplan Meier fue usado para el análisis de supervivencia con dos replicas .

### 6.3.9. Efecto del Bacteriófago F4MIE en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti*

Los grupos de larvas expuestos únicamente al bacteriófago F4MIE (LF) lítico de *Enterobacter xiangfangensis* mantuvieron una densidad alta de larvas vivas por 5 días. En ese sentido, la probabilidad de sobrevivir 5 días fue de 0.90; es decir, el 90% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. En los días 6 y 7, se observó que la supervivencia de las larvas disminuyó hasta un 70 y 50%, respectivamente. A partir del día 7, la probabilidad de que las larvas sobrevivieran se mantuvo en una reducción constante del 0.10 por día; con una supervivencia del 30% en el día 9. Para el día 10, la probabilidad de sobrevivir fue de 0.22; es decir, solo el 22% de las larvas sobrevivieron al menos 10 días; y solo el 10% sobrevivió al menos 12 días. Larvas de *Aedes aegypti* expuestas únicamente al fago F4MIE sobrevivieron al menos 17 días (figura 9).

#### **6.3.10. Efecto del Bacteriófago F4MID en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos expuestos únicamente al bacteriófago F4MID (LF) lítico de *Klebsiella variicola* mantuvieron una densidad alta de larvas vivas por 7 días. En ese sentido, la probabilidad de sobrevivir 5 días fue de 0.95; es decir, el 95% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. En los días 6 y 7, la supervivencia disminuyó hasta un 90 y 82.5%, respectivamente. La probabilidad de sobrevivir ocho días se mantuvo por arriba del 0.75; pero se observó una caída fuerte en la probabilidad de sobrevivir más de 9 días, ya que disminuyó de 0.75 a 0.55. La probabilidad de sobrevivir bajó a 0.45 y 0.22 los días 10 y 12, respectivamente. Larvas de *Aedes aegypti* expuestas únicamente al fago F4MID sobrevivieron al menos 14 días (figura 10).

#### **6.3.11. Efecto de *Enterobacter xiangfangensis* Infectada con el Bacteriófago F4MIE en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos de larvas de *A. aegypti* expuestos a *Enterobacter xiangfangensis* infectada con el bacteriófagos F4MIE tuvieron una probabilidad de sobrevivir 5 días de 0.85; es decir, el 85% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. En los días 6 y 7, la probabilidad de sobrevivir

disminuyó hasta un 0.75 y 0.65, respectivamente. En los siguientes tres días, la supervivencia de las larvas bajó a 55% en el día 8, a 37.5% en el día 9 y a 25% en el día 10. Es decir, la probabilidad de sobrevivir, pasó de estar en 0.65 en el día 7 a 0.25 en el día 10. Bajó 0.40 (40% de supervivencia) en solo 3 días. Por otra parte, del día 11 al 14, la probabilidad de sobrevivir se mantuvo en 0.15 (15% de supervivencia). Larvas de *A. aegypti* expuestas a *E. xiangfangensis* infectada con el fago F4MIE sobrevivieron al menos 14 días (figura 9).

### **6.3.12. Efecto de *Klebsiella variicola* Infectada con el Bacteriófago F4MID en la Supervivencia de Larvas de *Aedes aegypti***

Los grupos expuestos a *Klebsiella variicola* infectada con el bacteriófago F4MID, tuvieron una probabilidad de sobrevivir 5 días de 0.90; es decir, el 90% de las larvas sobrevivieron por al menos 5 días. Los días 6 y 7, la probabilidad de sobrevivir fue de 0.82 y 0.77, respectivamente. Durante las siguientes 24 h, la supervivencia se mantuvo superior a 75%. A partir del día 9 (70% de supervivencia), la supervivencia disminuyó diariamente pero a una velocidad muy lenta, ya que el porcentaje bajó 5, 2.5 y 5% los días 10 (65% de supervivencia), 11 (62.5% de supervivencia) y 12 (57.5% de supervivencia), respectivamente. Para el día 13, la supervivencia se mantuvo por encima de 40%; y es en este punto fue donde se observó una caída fuerte en la supervivencia, ya que pasó de 45 a 7.5% del día 13 al 15. Esto quiere decir, que las larvas alcanzaron la etapa de pupa a una velocidad muy lenta en los primeros 12 días, posiblemente por el bacteriófago inoculado; además, fue en los días del 13 al 15 donde hubo mayor emergencia de pupas (con algunas larvas muertas) durante el experimento (figura 10).

Se ha demostrado que bacterias simbióticas tienen efectos positivos en algunas actividades biológicas de los insectos. Dichos efectos se han observado en moscas domésticas (*Chironomus*: Diptera) al ser tratadas con bacteriófagos. Zhang *et al.* (2021), reportan que para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria que coloniza naturalmente los intestinos de larvas de la mosca doméstica, ha demostrado ser esencial para protegerlas de infecciones fúngicas (acción entomopatógena). En dicho estudio, posterior a un tratamiento con bacteriófagos, se removió hasta

un 90% la presencia de *P. aeruginosa* del intestino; se observó que una dosis baja de fagos no es suficiente para afectar la salud de las larvas de la mosca doméstica; sin embargo, aplicar fagos cada 24 horas fue suficiente para causar cambios en la composición bacteriana de sus intestinos. En resumen, demostraron que la eliminación/reducción de una bacteria intestinal simbiótica mediada por el uso de bacteriófagos tiene efectos negativos en el desarrollo del insecto (Zhang *et al.* 2021). Estos resultados indican la importancia de las bacterias simbióticas intestinales en la composición normal de la microbiota en los insectos, y el potencial efecto de los bacteriófagos para modular intencionalmente la composición de la biota bacteriana intestinal de los mosquitos, y así el control de vectores.

Por otra parte, Xu *et al.* (2016), al experimentar con la chinche del sur *Blissus insularis* administrándole antibióticos y bacteriófagos vía oral, demostraron que los antibióticos suprimen el simbionte *Burkholderia* spp., provocando un desarrollo retardado, tamaño corporal más pequeño y una mayor susceptibilidad a insecticidas. Sin embargo, al intentar reducir la población de los simbioses intestinales mediante un tratamiento con bacteriófagos no hubo efectos sobre la anatomía y fisiología de la chinche, debido a que los fagos ingeridos no lograron impactar la bacteria *Burkholderia*, gracias al bloqueo de la conexión entre el intestino anterior y posterior. Estos resultados sugieren que la colonización inicial por *Burkholderia* en *Blissus insularis* genera un cambio en la estructura del intestino medio, provocando una protección contra microorganismos antagonistas.

En el trabajo de Pan (2019), se investigó el uso de los bacteriófagos como herramienta para modular la composición de la microbiota en el agua de cría de larvas de *Aedes aegypti*. Las larvas se colocaron en condiciones gnotobióticas en donde diferentes bacterias fueron inoculadas en el agua de cría, con el fin de estudiar el efecto de la modulación de la microbiota mediada por bacteriófagos en el tiempo hasta la pupa. Se usaron seis especies de bacterias: *E.coli* W3110, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., dos especies de *Microbacterium* y *Arthrobacter* spp. De esta forma, al comparar los tratamientos de *E.coli* sin bacteriófagos y con bacteriófagos el tiempo de pupación de las larvas de *Aedes aegypti* se prolongó de 5.65 a 7.38 días y el porcentaje de supervivencia disminuyó de 97% a 81%. Los resultados sugieren que la aplicación de bacteriófagos en larvas de *Aedes aegypti* tiene un efecto positivo como agente de control biológico al disminuir la supervivencia de las larvas y

prolongar su tiempo de pupación. Estos resultados muestran similitud con lo encontrado en nuestra investigación, pues *Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola* también lograron prolongar el tiempo de pupación y acortaron el tiempo de vida de larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio. Por otra parte, en el mismo estudio de Pan (2019), la especie 1 de *Microbacterium* no pudo rescatar el desarrollo larvario en absoluto, independientemente de la cantidad de bacterias añadidas; y la especie 2 de *Microbacterium* tuvo tasas de pupación muy bajas (17.6%). Estos datos sugieren que *Microbacterium* spp., tienen un efecto de biocontrol sobre las larvas de *A. aegypti*. Es por ello, que este tipo de estudios aporta conocimiento muy valioso, ya que se revela las funciones de cada especie bacteriana en la vida y desarrollo de especies de mosquitos de interés. Este tipo de resultados remarcan la importancia de seguir experimentando con más bacterias y bacteriófagos para observar sus efectos en el ciclo de vida del vector, que permitan un mejor entendimiento de este sistema complejo de simbiosis y para la búsqueda de estrategias de control de vectores virales.

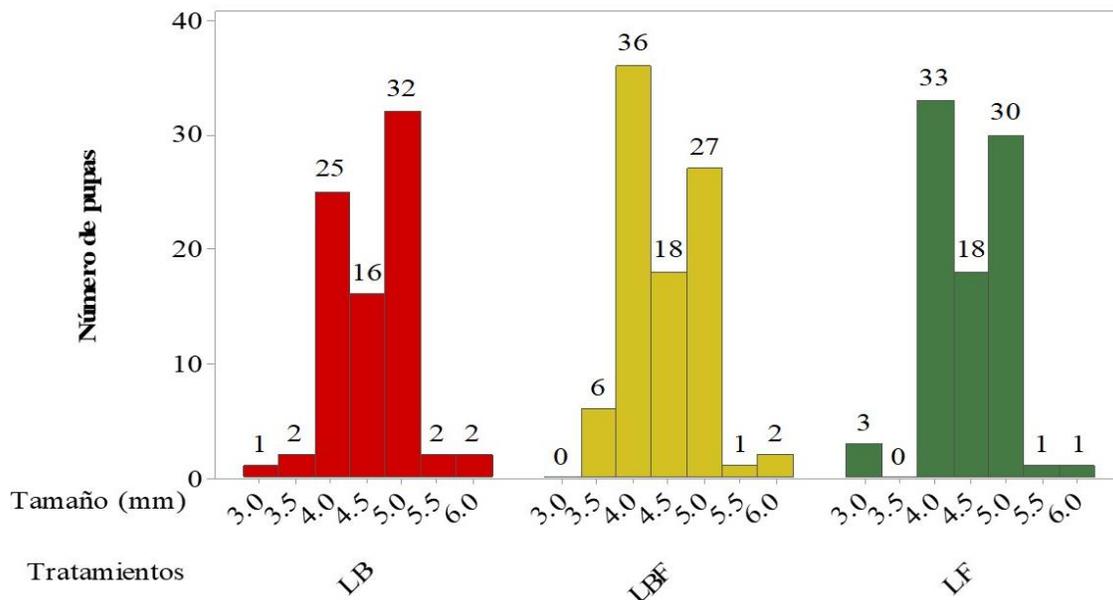
#### 6.4. Efecto en el tamaño de pupas de *Aedes aegypti* por la Exposición a Bacterias y Fagos

Para evaluar el efecto de las bacterias y los bacteriófagos en larvas de *Aedes aegypti* en los experimentos desarrollados, se monitoreó su crecimiento diariamente hasta que alcanzaron la etapa de pupa. Larvas del tercer estadio fueron expuestas a tres tratamientos por cada bacteria en estudio (*Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*), los cuales consistieron en: larvas gnotobioticas con cada bacteria por separado (LB), larvas gnotobioticas infectadas con fagos (LBF) y larvas axénicas infectadas con fagos (LF). Una vez alcanzada la etapa de pupa, éstas fueron recolectadas y medidas en el laboratorio de conservación de la fauna silvestre en la facultad de biología en la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los datos analizados demostraron que no hubo diferencias significativas en el tamaño de las pupas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Con medias de 4.56, 4.42 y 4.45 mm para LB, LBF y LF, respectivamente (figura 11).

El tiempo de pupación está correlacionado con el peso corporal y con el tamaño del adulto emergido (Baneriee *et al.*, 2017). En cuanto al tamaño corporal de los mosquitos alados, podrían tener efectos en la capacidad vectorial, esto debido a que los mosquitos de menor tamaño

(emergidos de pupas con desarrollo rápido) aumentan su tasa de picadura para compensar la cantidad de sangre ingerida, aumentando de esta manera la probabilidad de infectarse con arbovirus y transmitirlo de forma horizontal al ser humano (Naksathit y Scott, 1998).

Los resultados del presente estudio, sugieren que los bioensayos con larvas de *Aedes aegypti* expuestas a bacterias y fagos, tuvieron un efecto en el tiempo de pupación (dato mostrado anteriormente), con una emergencia de pupas con desarrollo lento; a su vez, esto influyó en el tamaño del vector ya que se obtuvieron pupas entre 4.5 y 5 mm; dado que el tamaño corporal de los mosquitos alados podría tener efecto en la capacidad vectorial, mosquitos de mayor tamaño (emergidos de pupas con desarrollo lento) son menos competentes en la capacidad vectorial ya que tienen una tasa de picadura menor, por lo que se reduce la probabilidad de infectarse con arbovirus y transmitirlo de forma horizontal al ser humano. Por otro lado, mosquitos macho de menor tamaño tienen menos probabilidad de ser seleccionados por una hembra para copular, pues es parte de la selección natural en los animales, mosquitos macho de mayor tamaño y con mejores atributos fenotipicos, tienen más probabilidad de copular.



**Figura 11.** Gráfica de barras de la proporción de tamaño de pupas de *Aedes aegypti*. Larvas gnotibioticas (LB), larvas gnotibioticas infectadas con fagos (LBF) y larvas axénicas infectadas con fagos (LF). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0.269$ ) expuestos a las bacterias *Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*.

## 6.5. Proporción Sexual de *Aedes aegypti* Expuestas a Bacterias y Bacteriófagos

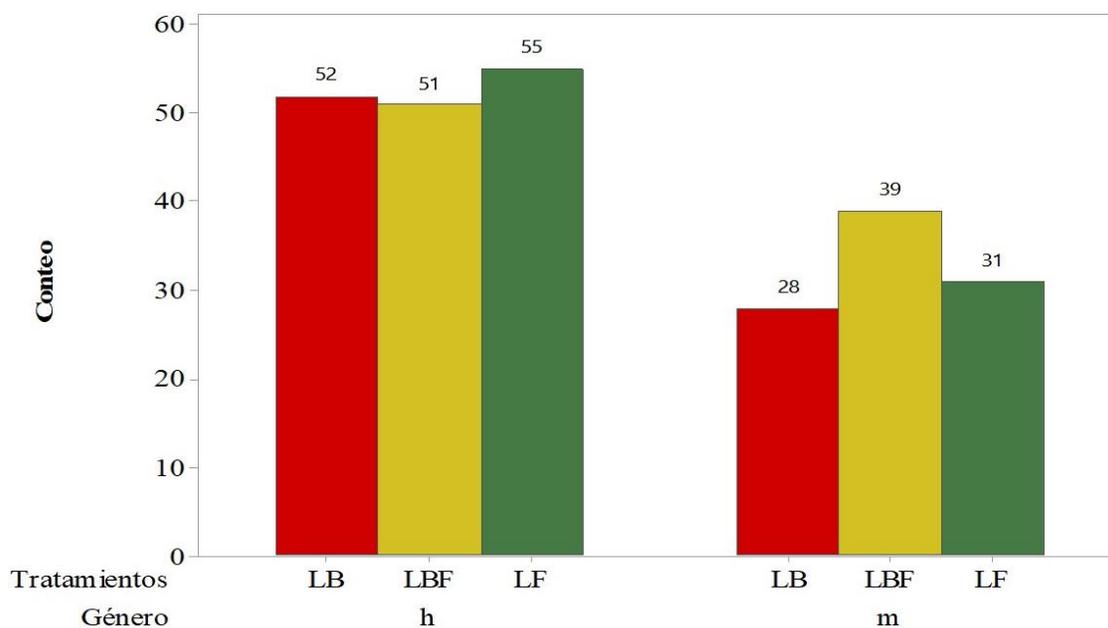
Otra de las variables de respuesta de los ensayos fue la proporción sexual de las larvas al llegar a pupa una vez expuestas a los diferentes tratamientos. Como puede observarse en la figura 12, se presentó mayor presencia de hembras que machos en las larvas que fueron expuestas a todos los tratamientos.

Estos resultados sugieren que al exponer a larvas de *Aedes aegypti* en su tercer estadio a cualquier tratamiento, ya sea con *Enterobacter xiangfangensis* o *Klebsiella variicola*, a la combinación de las bacterias con sus respectivos bacteriófagos o sólo a los bacteriófagos, la probabilidad de que sean hembras es mayor a que sean machos. Por otra parte, en el trabajo de Lee-Jin *et al.* (2021), aunque obtuvieron una proporción sexual con sesgo hacia los machos debido a la mortalidad de las hembras inmaduras, demostraron que los mosquitos contrarrestan cualquier deficiencia en los rasgos para producir un crecimiento poblacional homogéneo (entre machos y hembras); ya que, mantener una densidad de población óptima es esencial para que los mosquitos *Aedes* aumenten la probabilidad de encontrar pareja y reducir el efecto Allee (disminución de la tasa de supervivencia y tasa de reproducción); y por ende, mantener la especie.

Por otra parte, en los mosquitos, las hembras a diferencia de los machos son más grandes en su etapa adulta (Wormington y Juliano, 2014), propiciando tiempos de emergencia más largos (Chandrasegaran *et al.* 2018). Así mismo, las hembras al estar más tiempo interactuando en sus hábitats se exponen mayor tiempo a las condiciones del medio, ocasionando una tasa de mortalidad larvaria superior comparada con los machos (Chandrasegaran *et al.*, 2018).

En resumen, del intestino medio de los mosquitos *Aedes aegypti* recolectados en la ciudad de Culiacán Sinaloa, se aislaron 51 colonias bacterianas, de las cuales, después del análisis filogenético se identificaron 31 especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bhargavaea*, *Priestia*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Salanicoccus*, *Cronobacter* y *Olivibacter*; en donde, *Bacillus* spp. fue el género predominante en la mayoría de los aislados. Se planteó aislar bacteriófagos del intestino medio de

*Aedes aegypti* los cuales presentaran actividad estrictamente lítica contra algunas de las bacterias identificadas. Sin embargo, no se lograron aislar. Por ello, se emplearon bacteriófagos y bacterias previamente aislados en otro trabajo para los bioensayos con larvas. En dicho estudio, la aplicación de diferentes tratamientos LBF, LB y LF tuvieron un efecto negativo en el desarrollo del vector, ya que prolongó el tiempo de pupación durante la etapa larva-pupa un mínimo de 14 días y un máximo de 21 días. El tiempo de pupación, al estar correlacionado con el tamaño del adulto emergido, y éste último a la capacidad vectorial; implica que mosquitos emergidos de pupas con desarrollo lento presentan tamaños más grandes y por ende, una tasa de picadura menor, por lo que se reduce la probabilidad de infectarse con arbovirus y transmitirlo al ser humano. Estos resultados presentan un panorama favorable para la aplicación de bacteriófagos como una alternativa para reducir y/o controlar la población de *Aedes aegypti*.



**Figura 12.** Gráfica de barras de la proporción sexual de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a los tratamientos. Larvas gnotobióticas (LB), larvas gnotobióticas infectadas con fagos (LBF) y larvas axénicas infectadas con fagos (LF). Los valores (n=256) representan ambas bacterias (*Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*).

## 7. CONCLUSIONES

Se aislaron 51 bacterias del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* capturados en la ciudad de Culiacán, Sinaloa; de los cuales, después del análisis filogenético se identificaron 33 especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bhargavaea*, *Prestia*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Salinicoccus*, *Cronobacter* y *Olivivacter*. En donde, los predominantes fueron *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Arthrobacter*.

No se lograron aislar bacteriófagos líticos contra las bacterias identificadas en este estudio. En su defecto se tomaron los fagos y bacterias de un trabajo previo del grupo de investigación para hacer los bioensayos con larvas de *Aedes aegypti*. La exposición ante diferentes tratamientos LBF, LF y LB con sus respectivas bacterias (*Enterobacter xiangfangensis* y *Klebsiella variicola*) tuvieron un efecto negativo en el desarrollo del vector durante la etapa larva-pupa, generando la emergencia de pupas con un desarrollo lento, prolongándose por un mínimo de 14 días y un máximo de 21 días. Lo anterior, desde una perspectiva de control biológico, representa un resultado favorable para el uso tanto de los bacteriófagos como de las bacterias utilizadas en este estudio, ya que pueden ser una alternativa potencial para reducir y/o controlar la población de *Aedes aegypti*.

## 8. RECOMENDACIONES

- Ampliar el área de muestreo de mosquitos en toda la ciudad de Culiacán para identificar la diversidad bacteriana intestinal en larvas de *Aedes aegypti*
- Comparar la diversidad bacteriana entre los estadios larvales, pupas y adultos
- Comparar la diversidad bacteriana intestinal de *Aedes aegypti* por periodos del año
- Ampliar el cepario de bacteriófagos mediante la búsqueda de bacteriófagos líticos contra bacterias intestinales del mosquito
- Diseñar tratamientos que incluyan una mayor diversidad de bacterias con bacteriófagos en larvas, a fin de evaluar su comportamiento.
- Realizar funciones de supervivencia con la mortalidad de los mosquitos
- Realizar un estudio de metagenómica para identificar en su totalidad su diversidad bacteriana intestinal cultivable y no cultivable

## 9. REFERENCIAS

- Ackermann, H. W. (2009). Phage Classification and Characterization. (M. R. Clokie, & A. M. Kropinski, Edits.) *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation and Characterization and Interactions*. Humana Press, 127-140 pp.
- Ackermann, H. W., & Dubow, M. S. (1987). Practical applications of bacteriophages. *In Viruses of prokaryotes: general properties of bacteriophages*, CRC Press, Boca Raton, Fla., USA. 143-158 pp.
- Apte-Deshpande, A., Paingankar, M., Gokhale, M. D., & Deobagkar, D. N. (2012). *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. *PLoS ONE*, 7(7):e40401.
- Araújo, G. G., Sampaio, A. P., Portela-Júnior, N. C., Fontes de Oliveira, C. M., Luiz de Lima, J., Brayner, F. A., & Alves, L. C. (2019). Use of MALDI-TOF MS to identify the culturable midgut microbiota of Laboratory and wild mosquitoes. *Acta Tropica*, 105174.
- Azevedo-Santos, V. M., Vitule, J. R., Pelicice, F. M., García-Berthou, E., & Simberloff, D. (2016). Nonnative Fish to Control *Aedes* Mosquitoes: A Controversial, Harmful Tool. *BioScience*, 84-90.
- BANCO MUNDIAL. (22 de Febrero de 2016). *BANCO MUNDIAL*. Obtenido de Cinco impactos económicos del zika en Latinoamérica: <https://www.bancomundial.org/es/news/feature/2016/02/22/cinco-impactos-economicos-zika-latinoamerica>
- Banerjee, S., Pramanik, S., Banerjee, S., Saha, G. K., & Aditya, G. (2017). Effects of density dependent larval competition on the life history traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Fragm Entomol*, 49(1): 97-107.
- Bates, M. (1970). *The natural history of mosquitoes*. Peter Smith, Gloucester, MA. 378pp.
- Biogents Mosquito Control. (2018). *Life cycle of Aedes aegypti*. Obtenido de Biogents SEA: <https://sea.biogents.com/life-cycle-aedes-mosquitoes/>
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* 4, 471-477.
- Carey-Smith, G. V., Billington, C., Cornelius, A. J., Hudson, J. A., & Heinemann, J. A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett*, 258(2): 128-6.
- Carlson, J. S., Short, S. M., Angleró-Rodríguez, Y. I., & Dimopoulos, G. (2020). Larval exposure to bacteria modulates arbovirus infection and immune gene expression in adult *Aedes aegypti*. *Developmental and Comparative Immunology*, 103540.
- Ceissens, P. J., & Lavigne, R. (2010). *Introduction to bacteriophage biology and diversity. Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*. Washington, DC: 11-29 pp.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades . (2015). *CENAPRECE*.

Obtenido de Guia para la instalacion y mantenimiento del insectario de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae): <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/GuiaInstalacionMantenimientoInsectarioAedesAegypti.pdf>

- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (13 de Diciembre de 2017). *Gobierno de México*. Obtenido de CENAPRECE: <https://www.gob.mx/salud/cenaprece/acciones-y-programas/direccion-del-programa-de-enfermedades-transmitidas-por-vectores>
- Chandrasegaran, K., Kandregula, S. R., Quader, S., & Juliano, S. A. (2018). Context dependent interactive effects of non-lethal predation on larvae impact adult longevity and body composition. *PLOS ONE*, 13(2): e0192104.
- Cheng, G., Liu, Y., Wang, P., & Xiao, X. (2016). Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in Parasitology*, 32(3): 177-186.
- Clokie, M. R., & Kropinski, A. (2009). *Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*. New York: Humana Press.
- Colman, D. R., Toolson, E. C., & Takacs-Vesbach, C. D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, 21(20): 5124-5137.
- Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016a). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Díptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 9:375.
- Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016b). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22):5806-5826.
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol.*, 23(11): 2727-2739.
- Culot, A., Grosset, N., & Gautier, M. (2019). Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. *Aquaculture*, 734423.
- De Gaio, A. O., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F., & Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & Vectors*, 4:105.
- Dickson, L. B., Jiolle, D., Minard, G., Moltini-Conclois, I., Volant, S., & Ghoulane, A. (2017). Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Science Advances*, 3(8): e1700585.
- Dirección General de Comunicación Social. (18 de Diciembre de 2015). *DGCS*. Obtenido de COSTO ECONÓMICO DEL DENGUE EN MÉXICO: [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2015\\_725.html#:~:text=%E2%80%9CCada%20a%C3%B1o%20el%20costo%20epidemiol%C3%B3gico,%E2%80%9D%20%20se%20pregunt%C3%B3%20Dur%C3%A1n%20Arenas](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2015_725.html#:~:text=%E2%80%9CCada%20a%C3%B1o%20el%20costo%20epidemiol%C3%B3gico,%E2%80%9D%20%20se%20pregunt%C3%B3%20Dur%C3%A1n%20Arenas).
- Fondos de las Naciones Unidas para la Infancia. (Mayo de 2016). *UNICEF*. Obtenido de Control del vector *Aedes aegypti* y medidas preventivas en el contexto del Zika: <https://www.unicef.org/lac/media/1381/file/PD%20Publicaci%C3%B3n%20Control%20de>

- Grose, J. H., & Casjens, S. R. (2019). Bacteriophage Diversity. *Reference Module in Life Sciences*.
- Gu, j., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., . . . Lu, R. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 7(3): e31698.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Bacci, M., Berbert-Molina, M. A., & Lemos, F. J. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Tropica*, 115(3): 275-281.
- Hagens, S., & Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11: 58-68.
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dabrowska, K., . . . Balcao, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212-213: 38-58.
- Hegde, S., Rasgon, J. L., & Hughes, G. L. (2015). The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Current Opinion in Virology*, 15:97-102.
- Ibañez-Bernal, S., & Martínez-Campos, C. (1994). Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la república mexicana (Díptera: Culicidae). *Folia Entomol*, 92: 43-73.
- ICTV. (July de 2021). *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Obtenido de Taxonomy: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradovic, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., . . . Momol, M. T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4): 208-214.
- Jun, J. W., Han, J. E., Giri, S. S., Tang, F. J., Zhou, X., Aranguren, L. F., . . . Park, S. C. (2018). Phage Application for the Protection from Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*. *Indian J Microbiol*, 58(1): 114-117.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. *Viruses*, 6(11): 4294-4313.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods in Molecular Biology*, vol 501.
- Lee, J. H., Lee, K. A., & Lee, W. J. (2017). Microbiota, Gut Physiology, and Insect Immunity. *Advances in Insect Physiology*, Volume 52, 111-138.
- Lee-Jin, B., Wu-Chun, T., & Kob-Boon, N. (Enero 2021). Interpopulation variations in life history traits and reproductive tactics in *Aedes aegypti*: A test on populations 50 km apart. *Acta Tropica*, Volumen 213: 105750.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., . . . Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4519-4526.

- López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., Valdez-Torres, B., & Chaidez, C. (2012). Evaluation of Bacteriophage av-08 for Simultaneous Biocontrol of *Salmonella montevideo* and *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Contaminated Chicken Skin. *Journal of Food Safety*, 32(3): 305-310.
- López-Guerrero, E. (2019). *Aislamiento de Bacteriofagos Líticos Contra Bacterias Esenciales de la Biota Intestinal de Aedes aegypti (diptera: Culicidae)*. (Tesis de maestría). Culiacán, Sinaloa: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6:146.
- Moineau, S. (2013). Bacteriophage. (S. Maloy, & K. Hughes, Edits.) *In Brenner's Online Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition, 280-283.
- Molina-Henao, E. H., Graffe, M. Y., De La Cadena, E. P., Serrato, I. M., Correa, A., Romero, L. V., . . . Ocampo, C. B. (2020). Culturable microbial composition in the midgut of *Aedes aegypti* strains with different susceptibility to dengue-2 virus infection. *Symbiosis*, 80, 85-93.
- Naksathit, A. T., & Scott, T. W. (1998). Effect of female size on fecundity and survivorship of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed only blood versus human blood plus sugar. *J. Am. Mosq. Control Assoc*, 14: 148-152.
- Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti: Biología y Ecología*. Washington, D.C: 525 Twenty-Third Street, N.W. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *OMS*. Obtenido de Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030: [https://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf](https://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf)
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *OMS*. Obtenido de Control biológico: [https://www.who.int/denguecontrol/control\\_strategies/biological\\_control/es/](https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/biological_control/es/)
- Organización Mundial de la Salud. (3 de Marzo de 2020). *OMS*. Obtenido de Enfermedades transmitidas por vectores: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Organización Mundial de la Salud. (10 de Enero de 2022). *OMS*. Obtenido de Dengue y dengue grave: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue#:~:text=El%20n%C3%BAmero%20de%20casos%20de,5%2C2%20millones%20en%202019.>
- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *PLISA Plataforma de Información en Salud para las Américas*. Obtenido de Casos de la Enfermedad del Virus del Zika: [https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com\\_content&view=article&id=528:zika-weekly-es&Itemid=353](https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=528:zika-weekly-es&Itemid=353)
- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *PLISA Plataforma de Información en Salud para las Américas*. Obtenido de Chkungunya: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/chikv-es.html>

- Ramírez, J. L., Souza-Neto, J., Torres-Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3): e1561.
- Raya, R. R., & Hébert, E. M. (2009). *Isolation of Phage via Induction of Lysogens. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. New York: Humana Press 23-32 pp.
- Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Díptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa*, 589.
- Russell, R. J., Scott, C., Jackson, C. J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M. C., . . . Oakeshott, J. G. (2011). The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 225-248.
- Saldaña, M. A., Hegde, S., & Hughes, G. L. (2017). Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(2): 81-93.
- Sambrook, J., & Russel, W. (2001). *Extracción of bacteriophage λ DNA from large-scale cultures using proteinase K and SDS. En: Irwin N. (ed.). Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 256-258.
- Scates, S. S., O'Neal, S. T., & Anderson, T. D. (2019). Bacteria-mediated modification of insecticide toxicity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 161:77-85.
- Sklar, I. B., & Joerger, R. D. (2001). Attempts to Utilize Bacteriophage to Combat *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection in Chickens. *Journal of Food Safety*, 21(1): 15-29.
- Strand, M. R. (2017). The gut microbiota of mosquitoes. *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 1*, 185-199.
- Strand, M. R. (2018). Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Currently Opinion in Insect Science*, 59-65.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (2015). *Secretaría de Salud*. Obtenido de Guía para la Instalación y Mantenimiento del Insectario de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae):  
file:///C:/Users/eras9/Desktop/GuiaInstalacionMantenimientoInsectarioAedesAegypti.pdf
- Tiffany-Pan. (2019). *Evaluation of the Effect of Bacteriophages on Mosquito Larval Development (Tesis de maestría)*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University.
- Tjaden, N. B., Thomas, S. M., Fischer, D., & Beierkuhnlein, C. (2013). Extrinsic incubation period of dengue: knowledge, backlog, and applications of temperature dependence. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(6): e2207.
- Tol, S. V., & Dimopoulos, G. (2016). Influences of the Mosquito Microbiota on Vector Competence. *Advances in Insect Physiology*, 51: 243-291.
- UNICEF. (Mayo de 2016). Obtenido de Control del vector *Aedes aegypti* y medidas preventivas en el contexto del Zika: [https://www.unicef.org/lac/sites/unicef.org.lac/files/2018-04/20161220\\_UNICEF\\_Control\\_Vector\\_Preencion\\_Zika\\_Esp\\_UNICEF.pdf](https://www.unicef.org/lac/sites/unicef.org.lac/files/2018-04/20161220_UNICEF_Control_Vector_Preencion_Zika_Esp_UNICEF.pdf)

- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, E., Morou, E., Della-Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104 (2): 126-131.
- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., . . . Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476: 450-453.
- Weaver, S. C., & Reisen. (2009). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85: 328-345.
- Wilke, A., & Marrelli, M. (2015). Paratransgenesis: A promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & vectors.*, 8(1): 342.
- World Health Organization. (6 de Abril de 2022). WHO. Obtenido de Paludismo: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- Wormington, J. D., & Juliano, S. A. (2014). Sexually dimorphic body size and development time plasticity in *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Evol. Ecol. Res.*, 16: 223-234.
- Xu, Y., Buss, E., & Boucias, D. (2016). Impacts of Antibiotic and Bacteriophage Treatments on the Gut-Symbiont-Associated *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae). *Insects*, 7(4): 61.
- Zhang X, W. S. (2021). Bacteriophage: A Useful Tool for Studying Gut Bacteria Function of Housefly Larvae, *Musca domestica*. *Microbiology Spectrum*, 00599-21.