

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MICROBIOTA INTESTINAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Y SU
RELACION CON EL NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS
TEMEFOS Y PERMETRINA.

POR:

HERIBERTO MIGUEL VILLEGAS RAMIREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
ENTOMOLOGIA MEDICA Y VETERINARIA

Diciembre, 2020

MICROBIOTA INTESTINAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Y SU
RELACION CON EL NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS
TEMEFOS Y PERMETRINA.

Comité de Tesis



Dr. Gustavo Ponce García
Director de Tesis



Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Secretario



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez
Vocal



Dra. Beatriz López Monroy
Vocal



Dr. Idelfonso Fernández Salas
Vocal



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Subdirectora de Posgrado

MICROBIOTA INTESTINAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) Y SU
RELACION CON EL NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS
TEMEFOS Y PERMETRINA.

Comité de Tesis



Dr. Gustavo Ponce García

Director de Tesis



Dr. Alberto Margarito García Munguía

Asesor externo

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por abrirme las puertas a una gran institución y por permitirme realizar la maestría.



A la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos los profesores que fueron parte de mi formación en la maestría. Donde quiera que vaya, llevare siempre conmigo sus enseñanzas.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PN-CONACYT-2019, No. 962141), por el apoyo para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA EN ESPECIAL

Para mi madre, mi ejemplo día con día, gracias por siempre estar para mí, ¡te amo mamá!

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Miguel Villegas y Rosa Ramírez, por ser mi apoyo incondicional, porque cuando tuve días difíciles estuvieron ahí en todo momento, creyendo en mí, a que nunca me diera por vencido, GRACIAS PAPÁ Y MAMÁ.

A mis 2 hermanas Brígida y Barbara Villegas, que son mi ejemplo a seguir día con día, son unas mujeres increíbles y muy fuertes, que no se limitan con alguna adversidad y eso es lo que más admiro de ustedes 2, son unas excelentes dentistas.

Al Dr. Gustavo Ponce, porque nunca pensé que mi director de tesis fuese a llegar a ser un gran amigo, lo admiro, lo estimo y lo respeto, gracias por darme la oportunidad de ser su estudiante, por esas risas, regaños y lecciones de vida, por siempre darme un buen consejo, cuando era necesario, GRACIAS.

A la Dra. Adriana Flores, un enorme respeto y agradecimiento hacia usted, porque estuvo en todo momento puliendo todos esos grandes y pequeños detalles en mi como en el proyecto, que estar en este laboratorio es un privilegio y una gran responsabilidad, el nivel de exigencia es bastante pero siempre está al pendiente de todos, como debe ser... She is the boss.

Al Dr. Iram Rodríguez, por brindarme la oportunidad de estar en su laboratorio, por ayudarme en el proyecto y corregirme cuando era necesario, gracias.

Al Dr. Idelfonso Fernández y Dra. Beatriz López, por darme su asesoría y apoyo en el proyecto, muchas gracias.

A la Dra. Karina Villanueva, porque estuvo al pendiente de mi en estos años, por ser ese apoyo incondicional, por ser de gran ayuda en el proyecto guiándome, pero sobre todo por ser una gran persona y amiga, siempre estaré ahí cuando me necesite.

A mi novia Daniela González, verte crecer como profesionista y como mujer en estos años ha sido algo sorprendente y maravilloso, gracias por ser mi hombro cuando lo necesite, en los momentos difíciles como en los buenos, tengo alado mío una gran mujer que llegara muy lejos, solo es cuestión de que te lo propongas, ¡Te amo CHINGO Y 2 COSTALES!

A mis 3 compañeros de maestría, Steban Mora, Francisco González y Mario Montalvo, aprendí mucho de cada uno de ustedes, nunca olvidare las reuniones, consejos, buenos y malos momentos, gracias por darme su amistad y donde quiera que los depare el destino, siempre estaré ahí apoyándolos.

A mis becarios, Leidi Aguilar, Vanesa Vázquez y Alexis, gracias por apoyarme en el proyecto, son excelentes estudiantes y sé que serán unos grandes profesionistas en el futuro.

Al resto de mis compañeros del laboratorio de entomología médica, muchas gracias por los buenos momentos de risas y aprendizaje, siempre den lo mejor.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
Clasificación taxonómica de <i>Ae. aegypti</i>	4
Ciclo de vida	4
Huevo	4
Larva	5
Pupa	5
Adulto	5
Microbiota en los insectos.	6
Función de la microbiota en la ovoposición y eclosión de huevos de mosquito.	9
Papel de la microbiota en las larvas de mosquito.	10
Microbiota en el mosquito adulto.	12
Control de <i>Ae. aegypti</i>	15
La relación de la microbiota con la resistencia a insecticidas.	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPOTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
MATERIAL Y METODOS	21
Sitio de colecta.....	21
Colecta de material biológico.	21
Establecimiento de la colonia en el laboratorio.	21
Establecimiento de la colonia en el laboratorio en medio inocuo.	22
Pruebas de susceptibilidad a temefos y permetrina en larvas.	23
Bioensayo Dosis Respuesta y Dosis Diagnostico.....	23
Análisis de datos.	23
Razón de resistencia.....	24
Determinación de microbiota.....	24
Extracción de ADN.....	24

PCR.....	25
Secuenciación.	30
Análisis Bioinformático.....	30
Análisis Estadístico.	30
Índices de diversidad alfa.....	30
Índice de Shannon-Wiener	30
Índice de Simpson	31
Índice de Fisher	31
Índice de Chao1.....	31
Prueba de t (Hutcheson, 1970).....	32
Índice de diversidad beta	32
Índice de Bray Curtis	32
RESULTADOS	33
Comunidades microbianas de larvas a nivel phylum de <i>Ae. aegypti</i>	34
Comunidades microbianas de larvas a nivel familia de <i>Ae. aegypti</i>	35
Comunidades microbianas de larvas a nivel especie de <i>Ae. aegypti</i>	40
Índices de diversidad alfa.....	45
Índice de Shannon-Weaver	45
Índice de Simpson	46
Índice de Fisher	47
Índice de Chao1.....	48
Prueba de t (Hutcheson, 1970).....	49
Índice de diversidad beta	50
Índice de Bray Curtis	50
DISCUSIÓN.....	51
Susceptibilidad.....	51
Microbiota.....	53
Índices de diversidad	57
CONCLUSIONES.....	59
LITERATURA.....	60
ANEXO	70

INDICE DE TABLAS

Table 1. Clasificación taxonomica.....	4
Table 2. Material utilizado para cría en medio inocuo	22
Table 3. Muestras procesadas para extracción de microbiota.....	24
Table 4. Comparativo de los 6 tratamientos a nivel especie con T de Hutchenson.....	32
Table 5. Dosis respuesta, dosis diagnóstico y razón de resistencia en larvas de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a temefos y cis-permetrina.....	33
Table 6. Comparativo de los 6 tratamientos a nivel especie con T de Hutchenson.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	6
Figura 2. Adquisición y transmisión de la microbiota de mosquito.....	12
Figura 3. Funciones de la microbiota intestinal en mosquito.....	15
Figura 4. Punto de colecta en el estado de Nuevo León.....	21
Figura 5. Sitio de colecta de larvas de mosquito en Guadalupe, N.L.....	22
Figura 6. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos y muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	34
Figura 7. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos y muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel phylum.	34
Figura 8. Composición bacteriana del tratamiento de campo y el tratamiento de New Orleans en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel phylum.	35
Figura 9. Mapa de calor de abundancia taxonómica a nivel familia de los 6 tratamientos. 35	
Figura 10. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel familia.....	36
Figura 11. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel familia.	37
Figura 12. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos en larvas en <i>Ae. aegypti</i> a nivel familia.	38
Figura 13. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel familia.	38
Figura 14. Composición bacteriana del tratamiento de New Orleans a nivel familia.	39
Figura 15. Composición bacteriana del tratamiento de campo a nivel familia.	39
Figura 16. Mapa de calor de abundancia taxonómica a nivel familia de los 6 tratamientos.	40
Figura 17. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.	41
Figura 18. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.	42
Figura 19. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.	43
Figura 20. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina muertos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.....	43
Figura 21. Composición bacteriana del tratamiento New Orleans en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.....	44
Figura 22. Composición bacteriana del tratamiento Campo en larvas de <i>Ae. aegypti</i> a nivel especie.....	44
Figura 23. Diversidad alfa (Índice de Shannon) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	45
Figura 24. Diversidad alfa (Índice de Simpson) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 25. Diversidad alfa (Índice de Fisher) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	47

Figura 26. Diversidad alfa (Índice de Chao1) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	48
Figura 27. Diversidad beta (Índice de Bray Curtis) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de <i>Ae. aegypti</i>	50

RESUMEN

Existen alrededor de 3500 especies de mosquitos pertenecientes a la familia Culicidae, dentro de las cuales en México se tienen registradas 225 especies pertenecientes a 21 géneros, siendo algunos de ellos de importancia medica veterinaria debido a su capacidad de transmitir diversos patógenos para el hombre y los animales.

El uso constante de insecticidas como organofosforados y piretroides, para el control del mosquito *Ae. aegypti* ha propiciado el desarrollo de resistencia a los mismos. Por lo cual en el presente estudio se determinó por medio de la metodología de bioensayos propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016), el nivel de susceptibilidad a los insecticidas temefos y cis-permetrina en la población de Guadalupe, N.L.

Los resultados obtenidos, mostraron que la población de Guadalupe presenta una CL_{50} : 0.022 ppm y una CL_{99} : 0.114 ppm para temefos, para cis-permetrina una CL_{50} : 0.071 ppm y una CL_{99} : 3.882 ppm. En la población susceptible New Orleans (NO), se obtuvo una CL_{50} : 0.003 ppm, una CL_{99} : 0.012 ppm para temefos y en cis-permetrina se obtuvo una CL_{50} : 0.001 ppm y una CL_{99} : 0.067 ppm. Con estos resultados se determinó la Razón de resistencia ($RRCL_{50}$), la cual para temefos presenta una tolerancia de $RRCL_{50}$: 7.33 y presentando una resistencia a permetrina una $RRCL_{50}$: 71.

En relación a las comunidades microbianas a nivel phylum indican que Proteobacteria es el que presenta mayor abundancia con 66.4%, Bacteroidetes con 19.8%, Actinobacteria con 11.4% y el resto representa menos del 5% de la abundancia de los 6 tratamientos. Así mismo los valores obtenidos a nivel familia mostraron que para los tratamientos temefos vivos, la bacteria con mayor abundancia fue Comamonadaceae con 48.33%, para temefos muertos fue Microbacteriaceae con 37.17%, para cis-permetrina vivos fue Comamonadaceae con 30.33%, en cis-permetrina muertos con 36.00%, para New Orleans fue Flavobacteriaceae con 41.30% y por último el tratamiento de campo, con Rhodocyclaceae con 32.23%.

A nivel especie, no se presentaron bacterias tanto para los tratamientos vivos como muertos de ambos insecticidas, que puedan influir en mayor o menor susceptibilidad, se presentaron diferencias en el número de especies, siendo campo la que presento mayor diversidad con 301, siendo Rhodocyclaceae_Na_sp con 31.93% la más abundante, el tratamiento de New Orleans fue el de menor diversidad con 36, siendo *Elizabethkingia meningoseptica* la más abundante con 38.12%.

Los índices de diversidad alfa, como los índices de Shannon, Chao1 y Fisher, indican que el tratamiento con más diversidad es campo, en cambio para Simpson, fue el tratamiento de cis-permetrina vivos el que presenta mayor diversidad, por último, por parte del índice beta, Bray Curtis, se presentó similitud entre los tratamientos vivos como en muertos de temefos, por otra parte, para cis-permetrina tanto vivos como muertos se presentó disimilitud. En conclusión, la microbiota intestinal en larvas de *Ae. aegypti* no influye en una menor o mayor susceptibilidad a insecticidas.

ABSTRACT

There are about 3500 species of mosquitoes belonging to the Culicidae family, within which 225 species belonging to 21 genera are registered in Mexico, some of them of veterinary medical importance due to their ability to transmit various pathogens to humans and animals.

The over human population, the effect of climate change among other factors, have favored the distribution of *Ae. aegypti*, for which they have applied various strategies for their control, among which is chemical control, a strategy whose implementation has caused an excessive use of insecticides, generating the phenomenon of resistance to them.

The results obtained showed that the Guadalupe population presents a CL_{50} : 0.022 ppm and a CL_{99} : 0.114 ppm for temephos, for cis-permethrin a CL_{50} : 0.071 ppm and a CL_{99} : 3.882 ppm. In the susceptible New Orleans (NO) population, a CL_{50} : 0.003 ppm, a CL_{99} : 0.012 ppm for temephos was obtained and in cis-permethrin a CL_{50} : 0.001 ppm and a CL_{99} : 0.067 ppm were obtained. With these results the Resistance reason ($RRCL_{50}$) was determined, which for temephos presents a tolerance of $RRCL_{50}$: 7.33 and presenting a cis-permethrin resistance a $RRCL_{50}$: 71.

In relation to the microbial communities at the phylum level, they indicate that Proteobacteria is the one with the highest abundance with 66.4%, Bacteroidetes with 19.8%, Actinobacteria with 11.4% and the rest represents less than 5% of the abundance of the 6 treatments. Likewise, the values obtained at the reproduction family level that for live temephos treatments, the bacteria with the highest abundance was Comamonadaceae with 48.33%, for dead temephos it was Microbacteriaceae with 37.17%, for live cis-permethrin it was Comamonadaceae with 30.33%, in cis-permethrin killed with 36.00%, for New Orleans it was Flavobacteriaceae with 41.30% and finally the field treatment, with Rhodocyclaceae with 32.23%.

At the species level, bacteria are not shown for both the live and dead treatments of both insecticides, which can influence greater or lesser susceptibility, differences in the number of species are shown, being the field the one that presented the greatest diversity with 301, being Rhodocyclaceae_Na_sp with 31.93% the most abundant, the New Orleans treatment was the least diverse with 36, being Elizabethkingia meningoseptica the most abundant with 38.12%.

The alpha diversity indices, such as the Shannon, Chao1 and Fisher indices, indicate that the treatment with the most diversity is field, whereas for Simpson, it was the live cis-permethrin treatment that presented the greatest diversity, finally, by of the beta index, Bray Curtis, there was similarity between the live and dead treatments of temephos, on the other hand, for cis-permethrin, both alive and dead, there was dissimilarity. In conclusion, the intestinal microbiota in larvae of *Ae. aegypti* does not influence a lower or higher susceptibility to insecticides.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores son responsables de más de 100 enfermedades que constituyen la carga global, causan más de 1 millón de muertes al año, lo que representa más del 17 % de todas las enfermedades infecciosas (OMS,2018; Carlson et al., 2019).

El mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* es una especie antropogénica, que prolifera en criaderos tropicales (OPS, 2019; OMS, 2019). Es el artrópodo más significativo en la transmisión de arbovirus y es responsable de enfermedades como Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), fiebre amarilla (YFV) y dengue (DENV) (OMS, 2016; Rodríguez et al., 2020).

La expansión de estas enfermedades puede explicarse en parte por una intensificación de las condiciones que favorecen la dispersión y proliferación de *Ae. aegypti* como resultado del comercio mundial y la urbanización no planificada; implementación ineficiente de programas de control de vectores debido a capacidades humanas, financieras y de infraestructura inadecuadas; suministro de agua errático y prácticas asociadas de almacenamiento de agua; eliminación ineficaz de residuos; y una falta de participación de la comunidad y voluntad política (Horstick et al., 2010; Gluber et al., 2011; Lindsay et al., 2017; Roiz et al., 2018).

Los mosquitos son hospederos de una variedad de microorganismos que se adquieren principalmente de sus hábitats, durante el desarrollo y de fuentes de alimentos en adultos (Guégan et al., 2018). Dentro de la microbiota se han determinado especies de bacterias como responsables de metabolizar insecticidas (Wu et al., 2006; Kwon, et al., 2005; Dada et al., 2019). Dada et al., 2019, postulan que la microbiota del mosquito puede contribuir así a la desintoxicación de insecticidas, lo que aumenta la resistencia en el huésped; un fenómeno que se ha demostrado anteriormente en plagas agrícolas (Kikuchi et al.,2012), pero que ahora se está investigando en artrópodos vectores (Soltani et al., 2017).

En base a los antecedentes que asocian la microbiota y su efecto en la susceptibilidad a insecticidas, el objetivo la presente investigación fue el de determinar el papel de la microbiota en larvas del mosquito *Ae. aegypti* asociada a la susceptibilidad a insecticidas piretroides y organofosforados.

ANTECEDENTES

Clasificación taxonómica de *Ae. aegypti*

Table 1. Clasificación taxonómica.

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Díptera
Familia	Culicidae
Tribu	Culicini
Genero	<i>Aedes</i>
Especie	<i>aegypti</i> (Linnaeus, 1762)

Ciclo de vida

Aedes aegypti presenta cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto que incluye dos ambientes o fases bien diferenciadas en su ciclo de vida: la fase acuática (larvaria o de estadios inmaduros) y la fase aérea que sólo corresponde el mosquito adulto o imago (Figura.1).

Huevo

Son aproximadamente de 1 mm de longitud, de color blanco al momento de la ovipostura, pero en poco tiempo inician el proceso de endurecimiento y horas después adquieren un color obscuro. Los huevos son colocados por las hembras individualmente a pocos centímetros del nivel del agua de los recipientes, y cada hembra grávida puede depositar sus huevos en varios recipientes. Los huevos son fecundados durante la postura y el tamaño de cada ovipostura está en función del tamaño del cuerpo del mosquito, volumen de sangre ingerida, la fuente sanguínea y la edad (Costero et al., 1998).

El desarrollo embrionario se completa en 48 horas si el ambiente es cálido y húmedo, pudiendo prolongarse hasta cinco días a temperaturas más bajas. Pasado este período la eclosión puede producirse en cualquier momento dependiendo de la temperatura del agua y la concentración de oxígeno (Shanon y Putman, 1934; Christophers, 1960; Hien, 1975).

Larva

Presenta un par de ojos, un par de antenas y el aparato bucal-filtrador. Los ojos tienen una función visual limitada, pero son sensibles y responden a estímulos o cambios de intensidad de luz. Las antenas cumplen funciones sensoriales y perciben la dirección de las corrientes de agua, así como cambios en los elementos químicos en ella. Las partes bucales presentan cerdas con las que atraen las partículas nutritivas a la boca por medio de corrientes generadas por su movimiento (Bates, 1949; Merritt et al., 1992).

Las principales características morfológicas específicas en el estado larvario son: la presencia de a) pelo en la parte superior, inferior y antenal cefálicos y sencillos; b) una hilera recta de 7 a 12 escamas del peine en el octavo segmento abdominal, cada una de las cuales tienen una espina media y dientes laterales de mayor tamaño y c) un par de espinas prominentes de posición lateral a cada lado del meso- y metatórax. (Christophers, 1960).

Pupa

A diferencia de la larva, no se alimenta y su función es exclusivamente la metamorfosis de la larva a adulto. Tiene forma de coma cuando se observa posada en la película de agua superficial. En ella destaca la presencia de dos proyecciones originadas del tórax a manera de cuernos que son las trompetas ventiladoras por donde obtiene el aire atmosférico para la respiración. La porción terminal del cuerpo presenta unas placas anchas a manera de paletillas que le sirven para el desplazamiento. Cuando las pupas están inactivas, se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad, propiedad que facilita la emergencia del imago. Esta etapa del ciclo de vida dura aproximadamente de dos a tres días (Christophers, 1960; Nelson, 1986).

Adulto

Representa la parte final del ciclo e inicio de la fase reproductiva. El mosquito adulto recién emergido pasa sus primeras 24 horas en reposo, posado sobre las superficies verticales sombreadas más cercanas al criadero, para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas, y en el caso de los machos, la rotación de la terminalia masculina en 180°. Después inicia un período de vuelos cortos en busca del sexo opuesto para copular y, en el caso de las hembras, de un hospedero para alimentarse (no hay orden para la cópula y la alimentación),

iniciándose la conducta de búsqueda entre las 24 y 72 horas de edad (Reyes-Villanueva, 1990).

Después de cada alimentación sanguínea (2-3 mg de sangre, hasta la repleción) se desarrolla un lote de huevos. Una vez que la hembra ingiere sangre y después de 48 a 72 horas, está lista para ovipositar (Carrada et al., 1984). Después de la oviposición, la hembra reanuda la conducta de búsqueda de hospedero (fuente proteínica) para el siguiente grupo de huevos (Klowden, 1990). La búsqueda de alimento y la puesta de huevos son eventos que definen el inicio y fin del ciclo gonotrófico o de oviposición del mosquito.

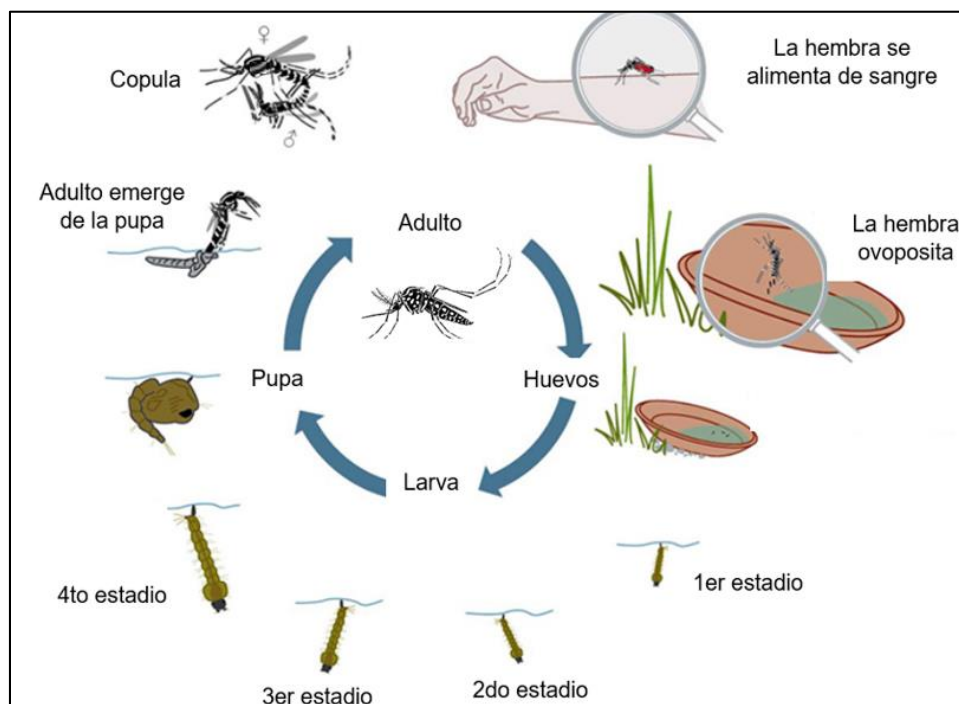


Figura 1. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*

Modificado de: <https://us.biogents.com/aedes-aegypti-yellow-fever-mosquitoes/life-cycle-aedes-aegypti-yellow-fever-mosquito-en/>, el 26 de julio del 2019.

Microbiota en los insectos.

La diversificación y el éxito evolutivo de los insectos han dependido en parte de la relación con microorganismos, que se sabe que mejoran las dietas pobres en nutrientes; ayuda a la digestión de componentes alimenticios recalcitrantes; proteger de depredadores, parásitos y patógenos; contribuir a la comunicación intraespecífica, afecta la eficiencia como vectores de enfermedades; y gobiernan los sistemas de apareamiento y reproducción. La contribución

de los microorganismos, particularmente los intestinales, a la función del insecto es muy relevante desde varias perspectivas, vinculando a la medicina, la agricultura y la ecología (Engel y Mora et al., 2013).

La microbiota intestinal se puede definir como la comunidad de microorganismos que viven en el tracto intestinal de un individuo, de forma intracelular (células especializadas) o extracelular (vida libre), representada por bacterias, virus, hongos, nematodos entre otros endosimbiontes (Gordon 2012), donde la interacción microorganismo-hospedero también es conocida como metaorganismo, la composición y actividad de la microbiota intestinal se desarrolla conjuntamente con el hospedero desde su nacimiento y está sujeta a complejas interacciones que dependen del genoma, nutrición y estilo de vida del hospedero (Bosch y McFall-Ngai 2011).

La microbiota intestinal está involucrada en la regulación de múltiples vías metabólicas en el hospedero, dando lugar a una señalización metabólica interactiva e inmunoinflamatoria entre el hospedero y su microbiota, ejes que fisiológicamente conectan el intestino, el músculo y el cerebro. Un entendimiento más profundo de estos ejes, es un prerrequisito para optimizar estrategias terapéuticas para la manipulación de la microbiota intestinal dirigidas hacia combatir enfermedades y mejorar la salud (Nicholson et al. 2012).

Las bacterias existen naturalmente en el intestino de insectos silvestres y se adquieren mediante la ingesta de azúcares (néctar, savia, secreciones de áfidos, soluciones azucaradas en laboratorio), obtención de sangre (alimentación artificial, fuentes de alimentación silvestre o experimental) y a través de materia orgánica en descomposición utilizada como alimento (heces de animales, lignina, hojarasca acumulada, basuras acumuladas) (Hurwitz et al. 2011, McCarthy et al. 2011). Se sabe por ejemplo que el éxito de la producción agrícola es fuertemente dependiente de las abejas polinizadoras y que la variabilidad de la microbiota debido a cambios ambientales, plaguicidas y presión de patógenos puede llevar a grandes pérdidas poblacionales. Estudios metagenómicos de la microbiota de abejas ha demostrado su papel en la nutrición y salud de estos insectos, con actividad importante sobre el metabolismo de los carbohidratos y la dieta. Es interesante notar que una nueva especie, *Snodgrassella sp.* junto a *Gilliamella sp.* protegen a esta especie de la invasión bacteriana principalmente en el intestino y en el recto (Engel et al. 2012).

Los primeros trabajos en esta especie fueron realizados por García y colaboradores en 2006, cuando se caracterizaron los microorganismos cultivables asociados con *Apis mellifera* a partir de polen almacenado y transportado en corbículas y tracto digestivo de las abejas (forrajeras y recién nacidas), aislando bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Arthrobacter* y hongos de los géneros *Rhizopus*, *Alternaria* y *Epicoccum*, que de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, algunas de estas bacterias pueden estar involucradas en la degradación de los compuestos de la capa externa del polen y son adquiridas por las abejas a través del alimento y contacto con otros individuos de la colmena. Los estudios para analizar la disminución en las poblaciones de la mariposa monarca *Danaus plexippus* también han sido realizados, en donde se ha descrito que los principales grupos bacterianos nativos encontrados en el abdomen son *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Pasteurella spp.* (Bravo 2009).

El hecho de que los insectos se alimenten de diversas dietas es porque algunas de estas presentan deficiencias nutricionales y son de difícil digestión por causa de moléculas complejas, en este sentido las bacterias del tracto digestivo son necesarias para la desintoxicación del material vegetal y para favorecer la disponibilidad de Fe⁺⁺ de los eritrocitos, de los aminoácidos esenciales y de vitaminas como el complejo B (Shu et al. 2010). La importancia de conocer la microbiota total y existente en el intestino de los insectos, no es únicamente por el conocimiento de la comunidad bacteriana total, sino también por el hecho que muchos microorganismos pueden tener un papel determinante sobre la reproducción, inmunidad, sobrevivencia y en el desarrollo de los parásitos especialmente cuando se trata de insectos vectores de enfermedades tropicales como malaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, filariasis, dengue, etc. (Azambuja et al. 2005a, Genes et al. 2011).

Las comunidades microbianas transitorias o residentes del tracto digestivo de los insectos vectores puede contribuir a entender las variaciones anuales o regionales registradas para la enfermedad; modular el desarrollo o alterar el ciclo de transmisión del parásito, bloquear el ciclo de vida del insecto (alteración de longevidad), incrementar la acción de los insectos por determinados hospederos mamíferos, o actuar como película para prevenir la colonización

de otros patógenos como los hongos entomopatógenos (Cirimotich et al. 2011, Vallet-Gely et al. 2011, Weiss y Aksoy 2011).

En los insectos transmisores de parásitos y virus a humanos de diversos géneros como *Lutzomyia*, *Aedes*, *Triatoma*, *Culex* y *Anopheles*, el primer punto de contacto entre los parásitos ingeridos con la sangre del hospedero y los vectores comienza en la superficie epitelial de su tracto digestivo, principalmente el intestino (barrera innata inespecífica y fisiológica) (Azambuja et al. 2005). En la actualidad, el uso de técnicas moleculares ha mejorado los análisis de identificación y función de los ecosistemas microbianos (Van Hamme et al. 2003). La ecología microbiana se basa en la amplificación directa y en secuenciar del gen ribosomal 16S rDNA a partir de cualquier muestra ambiental (Case et al. 2007). Los genes ribosomales son considerados excelentes marcadores moleculares ya que mantienen las características conservadas de todos los genomas bacterianos durante la evolución. La metodología de identificación bacteriana mediante la amplificación por PCR, seguida de electroforesis es fácil y simple. La secuenciación de las bandas obtenidas de la amplificación, permite detectar cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Van Hamme et al. 2003).

El conocimiento tanto de las bacterias como de las sustancias producidas por estas puede ser una estrategia para el control biológico de los insectos vectores y el tratamiento de las enfermedades tropicales causadas por virus y parásitos (Da Mota et al. 2012). Una aproximación para la prevención de enfermedades transmitidas por insectos vectores es el uso de bacterias genéticamente transformadas que expresen actividad antiparasitaria. Lindh et al., (2005) identificaron las bacterias intestinales de mosquitos *A. gambiae* y *A. funestus* basado en el gen 16S rRNA, revelando nuevas especies relacionadas con simbiontes conocidos y buscando el uso de estos como simbiontes transgénicos que lleven para dentro de los mosquitos toxinas antiparasitarias.

Función de la microbiota en la oviposición y eclosión de huevos de mosquito.

Además de colonizar el tracto digestivo, las bacterias en ambientes acuáticos también se han implicado en la mediación de las preferencias del sitio de oviposición y la incubación de huevos. Los experimentos con *Ae. aegypti* sugieren que las bacterias producen ácidos carboxílicos y metabolitos de ésteres metílicos que estimulan la oviposición por *Ae. aegypti*

(Ponnusamy et al., 2008). Se ha informado que los huevos de *Ae. aegypti* con una mayor abundancia de bacterias en su superficie eclosionan antes que los huevos con menos bacterias (Gillett et al., 1977), mientras que los experimentos que comparan la presencia y ausencia de bacterias en el ambiente acuático también muestran diferencias en tasas de eclosión de huevos (Ponnusamy et al., 2011). La forma en que las bacterias estimulan la eclosión es desconocida, pero las bacterias en la superficie de los huevos que promueven la incubación son probablemente miembros del microbiota intestinal del adulto.

Papel de la microbiota en las larvas de mosquito.

Los mosquitos, al igual que otros organismos vivos, son hospederos de microorganismos que se adquieren principalmente de sus hábitats de reproducción durante el desarrollo inmaduro y de fuentes de alimentos para adultos (Guégan et al., 2018).

Factores relacionados con el hábitat, la dieta y la vida pueden afectar a la comunidad de microorganismos que colonizan el tracto digestivo de los insectos (Clements, 1992), también muestran que la proporción de larvas que se convierten en adultos, así como el tamaño, la longevidad y la fecundidad de los adultos sobrevivientes varía entre las diferentes bacterias y los eucariotas unicelulares (Ramirez et al., 2012; Coon et al., 2016; Dickson et al., 2017; Valzania et al., 2018). En el caso de los mosquitos, todas las especies son acuáticas en sus etapas inmaduras, pero también exhiben preferencias de hábitat en términos de sitio de oviposición y donde forrajea la cría (Clements, 1992).

Primeros estudios de mosquitos con microorganismos intestinales utilizaron tioglicolato (medio para el cultivo de microorganismos anaerobios) y otros métodos de cultivo para mostrar y observar que las bacterias estaban presentes en las larvas (Hinman, 1930; Rozeboom, 1935; Chao y Wistreich, 1959; Jones y DeLong, 1961; Ferguson y Micks, 1961). Se han utilizado métodos dependientes combinados con la secuenciación para aislar y determinar el número de bacterias en larvas y adultos (DeMaio et al., 1996; Lindh et al., 2005; Rani et al., 2009; Dong et al., 2009; Chouaia et al., 2010; Gusmao et al., 2010; Cirimotich et al., 2011; Djadid et al., 2011; Terenius et al., 2012; Chavshin et al., 2012; Coon et al., 2014), como tintes fluorescentes como la acridina naranja o 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), donde estos métodos ayudan a estimar la abundancia (cantidad) de bacterias en el intestino durante diferentes etapas de la vida e identificar otros organismos, incluidos

protistas, algas, hongos y rotíferos (Hinman, 1930; Walker et al., 1988; Merritt et al., 1990; DeMaio et al., 1996).

Las larvas de mosquitos exhiben mayor mortalidad y / o retraso en el crecimiento hasta la etapa pupal cuando se reduce la abundancia de microorganismos en el hábitat acuático (Hinman., 1930; Rozeboom., 1935; Chao et al., 1963), también muestran que la proporción de larvas que se convierten en adultos, así como el tamaño, la longevidad y la fecundidad de los adultos sobrevivientes varía entre las diferentes bacterias y los eucariotas unicelulares (Ramirez et al., 2012; Coon et al., 2016; Dickson et al., 2017; Valzania et al., 2018). Recientemente, se ha informado aumento de la mortalidad y retraso en el crecimiento cuando las larvas se tratan con antibióticos (Wotton et al., 1997; Chouaia et al., 2012), mientras que la incorporación ciertas bacterias o levaduras promueve el crecimiento (Mitraka et al., 2013; Diaz et al., 2016).

Al considerar cómo las bacterias podrían promover el crecimiento, estudios recientes muestran que las larvas de *Ae. aegypti* incorporadas con una comunidad mixta de bacterias o *E. coli* de tipo silvestre presentan niveles de oxígeno intestinal notablemente más bajos en el intestino medio (hipoxia) que las larvas axénicas o las larvas gnotobióticas con un déficit de bacterias para la respiración aerobia (Coon et al., 2017). Esto sugirió que las bacterias en el intestino medio inducen una respuesta de hipoxia intestinal que podría funcionar como una señal de crecimiento.

Se han encontrado diferencias en la diversidad de especies bacterianas entre los estadios larvales de *Culex quinquefasciatus* (Pennington et al., 2016). Estudios de *Ae. aegypti* muestran que parte de la carga bacteriana en el intestino mueren al final de cada estadio antes de la muda, lo que brinda la oportunidad de alterar la composición de la comunidad intestinal en el estadio sucesivo (Coon et al., 2017). Otros patrones notables incluyen que la diversidad de especies bacterianas es consistentemente más alta en larvas de mosquitos que en adultos (Coon et al., 2014; Gimonneau et al., 2014; Dickson et al., 2017; Coon et al., 2016) y que la diversidad es menor criados en el laboratorio en comparación con los mosquitos recolectados en el campo de la misma especie (Coon et al., 2014; Boissiere et al., 2012; Wang et al., 2011).

Por lo tanto, los microorganismos de diversos taxones pueden inducir respuesta de hipoxia intestinal y crecimiento larvario, mientras que, en ausencia de microbiota, las larvas no

crecen ni mudan. En este sentido, la presencia de una microbiota es más crítica que su composición en comparación con los mosquitos sin microbiota intestinal. Sin embargo, la composición de la comunidad afecta en el fitness del mosquito, lo que indica que las especies individuales de microorganismos o combinaciones particulares de microorganismos benefician en el fitness del mosquito más que otras (Strand et al., 2018).

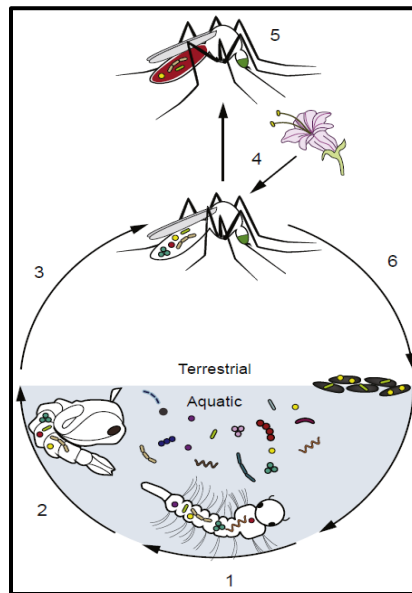


Figura 2. Adquisición y transmisión de la microbiota de mosquito. Las larvas de mosquitos ingieren bacterias y otros microorganismos presentes en su hábitat acuático. Algunos de estos miembros de la comunidad persisten y aumentan en abundancia en el intestino, mientras que otros declinan o no logran establecer (1). Algunos miembros de la microbiota intestinal larvaria persisten en la etapa pupal (2) y se transmiten a los adultos (3). Los adultos adquieren potencialmente otras bacterias del ambiente a través de la alimentación de nectarios extra florales (4). La alimentación de sangre por parte de las hembras hace que algunos miembros de la comunidad de microorganismos se incrementen en abundancia, mientras que otros miembros de la comunidad no persisten (5). Los huevos que ponen las hembras tienen algunas bacterias en su superficie que son miembros de la comunidad intestinal (6). Hegde, S. (2015). The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes.

Recuperado:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625715001303>, el 26 de julio del 2019.

Microbiota en el mosquito adulto.

Estudios se han centrado tanto en describir las especies de microorganismos que viven en hospedadores animales (Ellis et al., 2013; Mathieu et al., 2013) como en su impacto en la fisiología del hospedador (Devaraj et al., 2013; Pope et al., 2012), resultando en modelos

cada vez más complejos de la microbiota no como una amenaza inmunológica sino con un papel importante, si no esencial, en la salud del huésped.

El microbioma (los genomas colectivos de la microbiota) es una entidad dinámica que cambia de tamaño y composición en respuesta a los cambios en el estilo de vida del huésped (dieta, amenaza de infección, uso de antibióticos), a diferencia del genoma del huésped, que debe permanecer estático (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011). Esta disposición es mutuamente beneficiosa para el huésped y las bacterias, ya que el huésped proporciona un entorno estable y rico en nutrientes, y las bacterias ayudan en la digestión, protegen contra patógenos oportunistas y maduran el sistema inmunológico.

El conocimiento sobre la composición de la microbiota intestinal del mosquito se deriva de estudios de secuenciación metagenómica. La microbiota del mosquito se ha estudiado principalmente mediante el análisis de secuencia del gen 16S rRNA, utilizando métodos dependientes del cultivo e independientes del cultivo. (Villegas y Pimenta, 2014).

La mayoría de los microorganismos identificados en los mosquitos en estado larvario y adulto son aerobios gramnegativos o anaerobios facultativos que pertenecen preferentemente a cuatro filos (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria) (Coon et al., 2014; Boissiere et al., 2012; Buck et al., 2016; Wang et al., 2011; Osei-Poku et al., 2012; Yavad et al., 2015; Coon et al., 2016; Thongsripong et al., 2017). Varias bacterias identificadas como miembros de la comunidad intestinal en mosquitos también se han aislado y cultivado con éxito (Coon et al., 2014; Dickson et al., 2017; Damiani et al., 2010; Chavshin et al., 2015; Gusmao et al., 2011; Terenius et al., 2012).

Las bacterias en estos filos son miembros comunes de la comunidad en insectos de otros órdenes que adquieren su microbiota del medio ambiente (Yun et al., 2014), lo que sugiere que la prevalencia en parte refleja su abundancia en hábitats frecuentes de insectos. Los eucariotas unicelulares identificados como miembros de la comunidad intestinal en diferentes especies de mosquitos incluyen hongos, algas y Apicomplexa (protistas exclusivamente endoparásitos de animales), pero hasta ahora ninguno de estos organismos ha sido aislado de los mosquitos y cultivado de forma independiente (Muturi et al., 2016; Thongsripong et al., 2017; Chandler et al., 2015; Belda et al., 2017; Bozic et al., 2017; Bolling et al., 2015). Se sabe que algunos géneros bacterianos como *Asaia* son transmisibles tanto

horizontalmente (entre individuos de la misma generación) como verticalmente (de padres a descendientes); en este último caso, esto puede ser mediante la formación de manchas de la bacteria en los huevos en el tracto reproductivo (Damiani et al., 2010).

Las larvas se alimentan de microorganismos en su ambiente acuático, proporcionando un mecanismo claro para la colonización intestinal; sin embargo, después de la metamorfosis, se piensa que el intestino sufre dos procesos de reducción drástica en la carga de microbiota, dejando al intestino adulto recién emergido casi libre de bacterias. En primer lugar, las larvas del cuarto estadio indican el contenido del canal alimentario y la matriz peritrófica antes de pupar y, en segundo lugar, los adultos emergentes ingieren líquido de la exuvia que tiene propiedades bactericidas (Moll et al., 2001).

Función del microbioma en las infecciones virales.

Si bien es evidente que el microbioma afecta a los arbovirus, existe evidencia de que también se produce la interacción recíproca. En el mosquito tigre asiático *Ae. albopictus*, la infección por CHIKV aumenta la abundancia de bacterias en la familia Enterobacteriaceae y reduce *Wolbachia* y *Blattabacterium* (Zouache et al., 2012). Queda por determinar si las bacterias están respondiendo directamente al CHIKV o cambiando en respuesta a otros estímulos. Por ejemplo, se sabe que el CHIKV suprime la vía Toll (McFarlane et al., 2014) y la modulación inmunitaria mediada por virus inhibe la abundancia bacteriana general en *Ae. aegypti* (Ramírez et al., 2012).

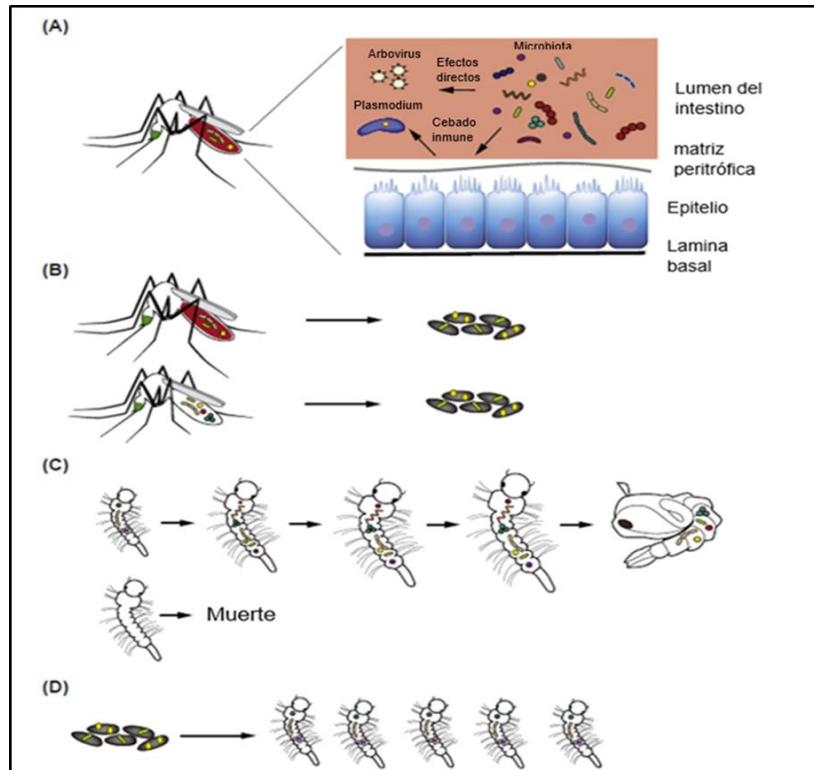


Figura 3. Funciones de la microbiota intestinal en mosquito. (A) Competencia de vectores. A la izquierda hay una hembra adulta, después de consumir sangre, mientras que a la derecha hay un esquema del intestino medio. La microbiota intestinal puede afectar negativamente la infección por algunos arbovirus y Plasmodium a través de la producción directa de factores inmunológicos. La microbiota intestinal también puede afectar positivamente la infección por arbovirus. (B) Adquisición de nutrientes y producción de huevos. La microbiota intestinal en *Ae. aegypti* anautógeno se ha implicado en la digestión de sangre, mientras que en el mosquito autógeno *Aedes atropalpus*, la microbiota intestinal afecta fuertemente la producción de huevos. (C) Desarrollo larvario. Varias especies de mosquitos se desarrollan con éxito con una microbiota intestinal, pero las larvas axénicas no se desarrollan más allá del primer estadio. (D) Incubación de huevos. Las bacterias en la superficie afectan las tasas de eclosión de huevos en *Ae. aegypti*.

Wikel, S. (2015) *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*, Volume 1. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/scie/B978012805350800118?via%3Dihub>, el 26 de julio del 2019.

Control de *Ae. aegypti*

El control integrado de vectores (CIV) es una estrategia que se debe considerar a la hora de decidir o ejecutar las acciones de control de *Ae. agypti*. La estrategia de CIV incluye la utilización de diferentes métodos, saneamiento ambiental, control químico, control biológico y la introducción de métodos genéticos más modernos (Rodríguez et al., 2014; Perez et al.,

2017). El control específico de mosquitos mediante la utilización de químicos, actualmente desempeña un papel en la salud pública como parte esencial de la gestión integral e integrada de vectores. Los métodos químicos más populares incluyen la aplicación de insecticidas con baja toxicidad dirigidos a larvas de mosquitos (larvicidas) y adultos (adulticidas). El control de larvas por reducción de la fuente y la aplicación rutinaria de larvicidas químicos, como los compuestos organofosforados y los reguladores del crecimiento de insectos, se considera una intervención fundamental (Ohimain et al., 2014; Soleimani et al., 2014; Chansang et al., 2018).

El manejo de vectores convencional, como la aplicación de adulticidas, sigue siendo el medio más eficaz de control durante un brote de virus, debido a la eliminación rápida y masiva de vectores de mosquitos infecciosos, así como a una reducción de la vida útil y la capacidad de reproducción total de las poblaciones de vectores locales (Bellini et al., 2014; WHO, 2016; Chansang et al., 2018). Cuatro clases de insecticidas químicos, a saber, organoclorados (exclusivamente DDT), organofosfatos, carbamatos y piretroides, son el pilar de los programas de control de vectores, y los piretroides son considerados como la clase más exitosa, ya que actúan sobre diversas especies de artrópodos y representan una baja toxicidad para los mamíferos (WHO, 2016).

Intervenciones de control se dirigen a las etapas inmaduras del mosquito, que se reproducen en contenedores artificiales cerca de las viviendas humanas. El método más utilizado para controlar los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* es el tratamiento periódico de los sitios de reproducción reales y potenciales con larvicidas químicos (Chavasse et al., 1997; WHO, 2009; Ranson et al., 2009). Uno de los métodos comúnmente empleados para el control del vector del dengue es el uso del temefos compuesto organofosforado (nombre comercial Abate) como un larvicida (Sztankay-Gulyás, 1992; George et al., 2015) debido a su rentabilidad y aceptación de la comunidad (Chavasse et al., 1997; Ranson et al., 2009; OMS, 2009; Grisales et al., 2013).

Temefos es un larvicida organofosforados registrados y producidos comercialmente para controlar las larvas del mosquito del género *Aedes* (Solís et al., 2014; Mohiddin et al., 2016). La actividad larvicida es importante en el control del vector porque la eficacia en el agua

contaminada, tiene actividad residual prolongada y se puede utilizar en cualquier estadio larvario (Chen et al., 2005; Mohiddin et al., 2016). Además, la deltametrina y la permetrina (clase piretroide) constituyen ahora la mayoría de los insecticidas comerciales y representan aproximadamente el 25% del mercado mundial de insecticidas (Muthusamy et al., 2014; Ramkumar et al., 2015; Chansang et al., 2018), se usan en todo el mundo como adulticidas a través de la pulverización espacial, la pulverización residual en interiores o los espirales para mosquitos (OMS, 2009).

En comparación con los insecticidas organofosforados, los piretroides tienen mayor aceptación por parte del público, debido a su alta eficacia para regular las poblaciones con una acción relativamente rápida (Bisset et al., 2009; Yap et al., 2018), costos relativamente bajos, y generalmente son la clase de producto elegida cuando se requiere la adulticida (Komalamisra et al., 2009; Estep et al., 2018). Actualmente, los insecticidas piretroides se están utilizando para controlar el adulto de *Ae. aegypti* en todo el mundo, constituyen aproximadamente el 17% de la cuota de mercado mundial de insecticidas y 1.4 mil millones de dólares en comercios globales (Housset et al., 2009; Yap et al., 2018). Sin embargo, perdieron su efectividad debido a la resistencia significativa a los mosquitos y el incumplimiento de la comunidad debido a la preocupación por la salud pública y los impactos ambientales de los químicos sintéticos. Esto causó grandes problemas que amenazaron el éxito de los programas de control de vectores (Vontas et al., 2012; Chareonviriyaphap et al., 2013).

La relación de la microbiota con la resistencia a insecticidas.

Actualmente, la resistencia a los insecticidas es uno de los problemas que enfrentan los programas de control de mosquitos (Harris et al., 2010, Ranson et al., 2010, Grisales et al., 2013, Pang et al., 2015). La dependencia excesiva y el uso continuo de estos insecticidas han resultado en el desarrollo de resistencia a los insecticidas en *Ae. aegypti* de diferentes partes del mundo (Harris et al., 2010, Ranson et al., 2010, Grisales et al., 2013, Pang et al., 2015).

No obstante, el aumento en el acceso a herramientas genómicas avanzadas ha facilitado la investigación de otros aspectos de la biología de los mosquitos, como su microbiota, que puede estar asociada con la resistencia a los insecticidas (Guégan et al., 2018).

Estudios describen las funciones de las comunidades microbianas intestinales de insectos y cómo puede contribuir a la resistencia a los insecticidas. Kikuchi et al., 2012, demostró que el simbionte intestinal *Burkholderia* media la resistencia a los insecticidas en *Riptortus pedestris* (Hemiptera) y la resistencia a los insecticidas facilitada por las cepas de *Burkholderia sp.* que degradan el fenitrotion pueden transferirse horizontalmente a otros insectos (Kikuchi et al., 2012; Kikuchi y Yumoto, 2013). En un estudio de un simbionte diferente, Cheng et al. (2017) reportaron que las cepas de *Citrobacter sp.* degradan el triclorfón. (CF-BD) aislado del intestino de *Bactrocera dorsalis* (Diptera) aumentando la resistencia a los insecticidas.

Por parte de los insecticidas biológicos, se han reportado roles conflictivos de las bacterias intestinales en la resistencia a las toxinas biológicas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). En un estudio, un aumento en la carga de microbiota intestinal de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) indujo una mayor tolerancia a Bt, lo que indica una relación entre las bacterias intestinales y la resistencia a los insecticidas (Hernández-Martínez et al., 2010), mientras que otro estudio informó que Bt fue ineficaz contra *Lymantria dispar* (Lepidoptera) cuando las bacterias intestinales habían sido tratadas con antibióticos, pero luego del restablecimiento posterior de la microbiota intestinal normal, incluida *Enterobacter sp.* se restableció la letalidad de Bt (Broderick et al., 2006), mientras que Frankenhuyzen et al. (2010) encontraron que las bacterias intestinales no contribuyeron a la mortalidad en *L. dispar* tratado con Bt.

JUSTIFICACIÓN

Factores como el incremento en la población humana, el movimiento migratorio de las personas, el desarrollo descontrolado de zonas urbanas y la pobreza expresada en problemas de vivienda, escasas de comida y de agua son algunos de los factores que han ayudado la dispersión y el establecimiento de *Ae. aegypti*. Por lo cual en México como en otros países de Latinoamérica, la incidencia de enfermedades transmitidas por insectos vectores ha aumentado en los últimos años, tal es el caso de las enfermedades como dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika, transmitidas por este vector.

La constante aplicación y el uso desmedido de insecticidas, ha generado el desarrollo del fenómeno de la resistencia la cual ha impulsado nuevas estrategias en el control de mosquitos, investigaciones previas mencionan que la microbiota del mosquito influye en el desarrollo, la alimentación, reproducción, la transmisión de enfermedades y en la susceptibilidad a insecticidas, donde se ha reportado que ciertas especies de bacterias como *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* pueden degradar insecticidas como malatión, imidacloprid, cipermetrina y bifentrina entre otros.

Con el objeto de conocer la función de la microbiota y su relación con el nivel de susceptibilidad a insecticidas en larvas de *Ae. aegypti*, en la presente investigación planteamos como objetivo determinar el papel de la microbiota en larvas de mosquito *Ae. aegypti* asociada a la susceptibilidad a insecticidas piretroides y organofosforados.

HIPOTESIS

La microbiota intestinal en larvas de *Ae. aegypti* (L) disminuye el nivel de susceptibilidad a insecticidas permetrina y temefos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la microbiota en larvas de *Ae. aegypti* en la susceptibilidad a insecticidas permetrina y temefos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la susceptibilidad en larvas de *Ae. aegypti* a temefos y permetrina mediante ensayos dosis respuesta.
- Determinar la razón de resistencia en larvas de *Ae. aegypti* a temefos y permetrina.
- Determinar dosis diagnóstico en larvas de *Ae. aegypti* al insecticida permetrina en una población susceptible.
- Caracterizar y comparar la microbiota de los individuos susceptibles y resistentes en ambos insecticidas.

MATERIAL Y METODOS

Sitio de colecta

El sitio de colecta comprendió el estado de Nuevo León, enfocándose principalmente en el municipio de Guadalupe, además se trabajó con la cepa susceptible New Orleans.

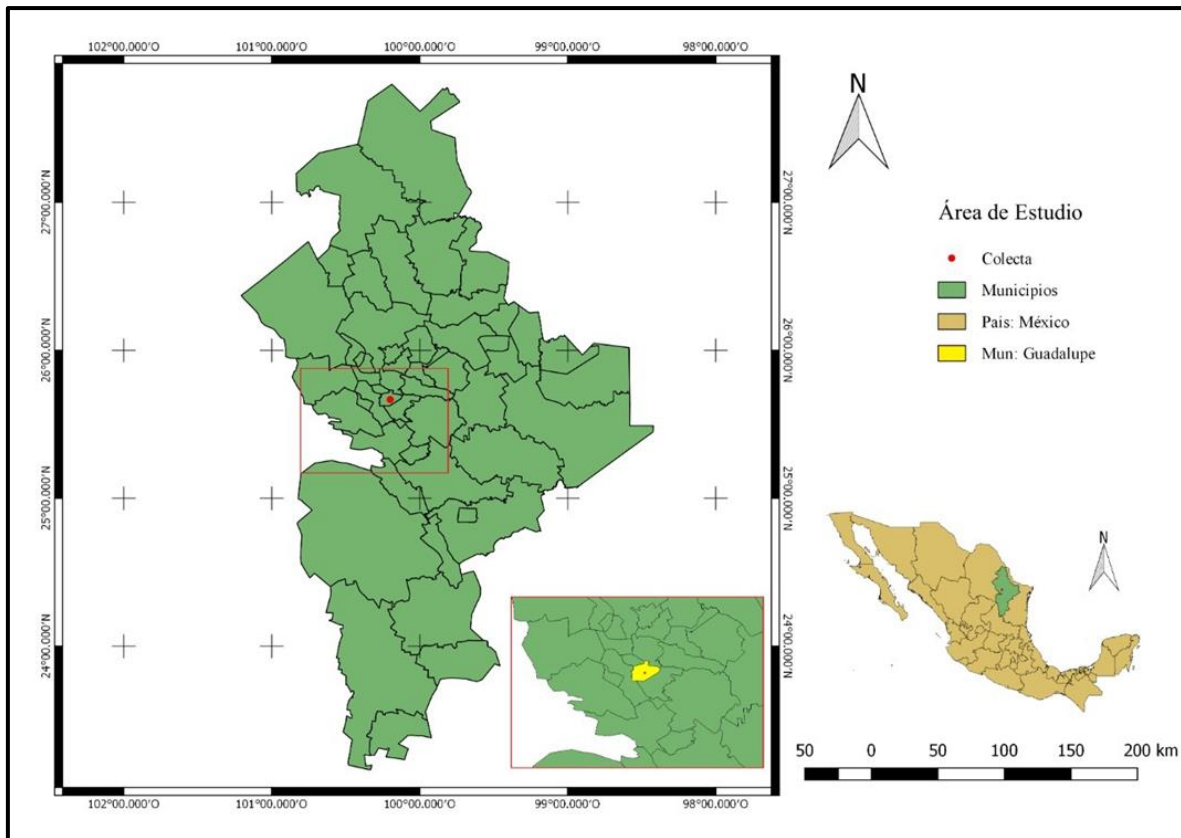


Figura 4. Punto de colecta en el estado de Nuevo León.

Colecta de material biológico.

Se realizó muestreos en el área de estudio durante los meses de abril y mayo 2019, donde se recolectó larvas de distintos estadios, las cuales se obtuvieron del sitio de reproducción de los mosquitos (agua estancada) mediante el uso de bulbos de silicona. El material recolectado se transportó en bolsas Whirl-Pak Nasco ® previamente esterilizadas por medio de luz UV dentro de termos conteniendo agua para minimizar el estrés causado por el traslado.

Establecimiento de la colonia en el laboratorio.

Las larvas fueron distribuidas en charolas de plástico de 35 x 25 cm conteniendo agua donde se realizó la colecta. Las larvas se alimentaron periódicamente con proteína de hígado de bovino en polvo (Liver poder MP Biomedicals, LLC) al 50% diluido en agua, las cuales se mantuvieron a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 60% y 12:12 L:O. Una vez que las larvas pasan al estadio de pupa, estas fueron transferidas a cámaras de

emergencia, al emerger los mosquitos se trasladaron a jaulas de cría de 30 x 30 cm. Los mosquitos macho se alimentaron con agua azucarada al 10% (fuente de carbohidratos) sobre algodones impregnados y las hembras con sangre de rata (*Rattus norvegicus*). Dentro de las jaulas se colocaron vasos de plástico con agua de cloro y papel filtro como sustrato para la ovoposición. Al extraer las papeletas (con huevos) estas se dejaron secar sobre las charolas para su posterior almacenamiento y se colocaron nuevas papeletas para la obtención de más huevos.

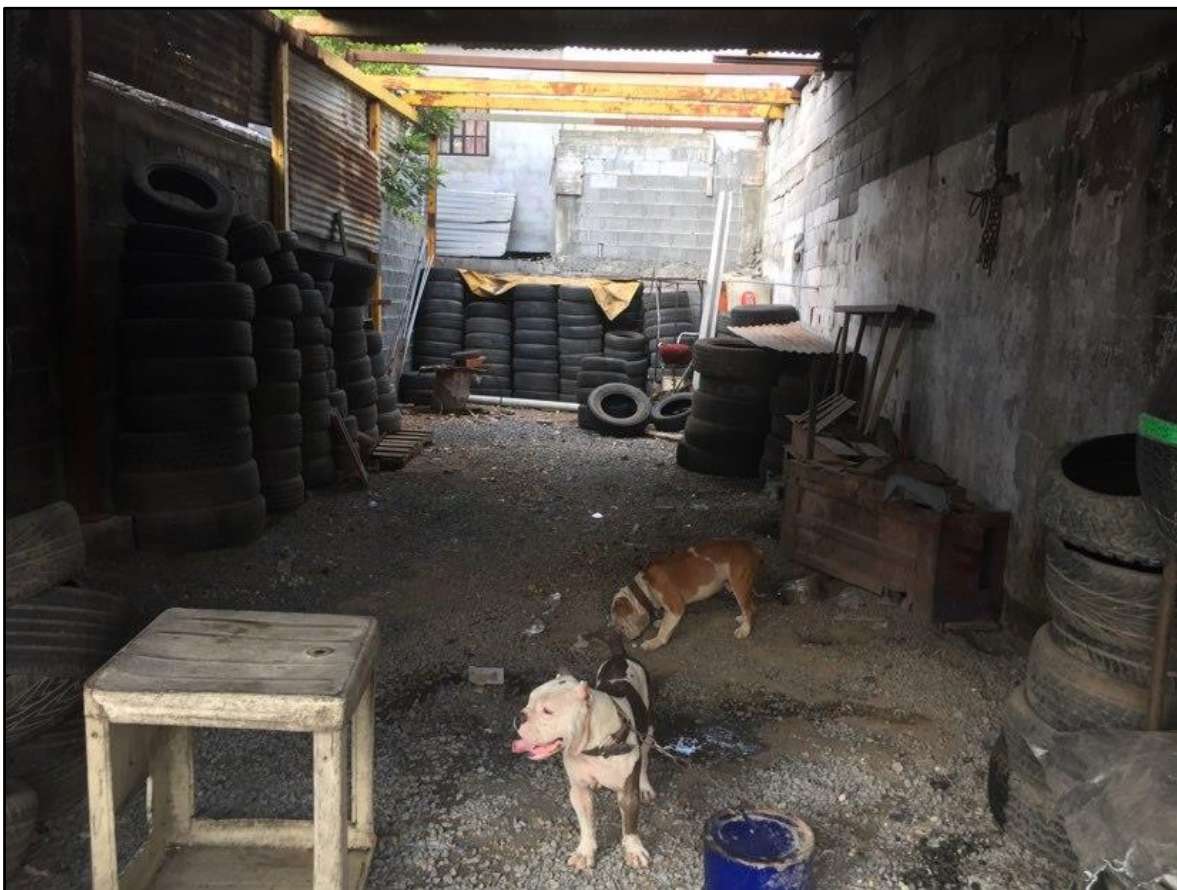


Figura 5. Sitio de colecta de larvas de mosquito en Guadalupe, N.L.

Los huevos contenidos en las papeletas fueron puestos a eclosionar para la obtención de larvas y adultos, continuando el ciclo hasta obtener la generación F_0 y F_1 .

Establecimiento de la colonia en el laboratorio en medio inocuo.

Se utilizó la metodología descrita por Correa et al., 2018 la cual se realizaron modificaciones sobre el material utilizado, el material se esterilizó por medio de luz ultravioleta o autoclave para su posterior uso y se realizó la misma metodología ya antes descrita.

Table 2. Material utilizado para cría en medio inocuo

Material estéril
Esterilización por autoclave
Charola de plástico de 35 x 25 cm
Agua destilada
Proteína de hígado de bovino en polvo
Solución de azucarada al 10%
Levadura al 10%
Papel filtro
Algodón
Esterilización por luz ultravioleta
Jaula de 30 x 30 cm
Cámara de emergencia

Pruebas de susceptibilidad a temefos y permetrina en larvas.

Preparación de solución stock

- A) Temefos (O, O, O´O´-tetrametil – O, O´-tiodi p-fenilen difosforotionato).
Una solución stock diluida en etanol (50 mg/ml) se preparó a partir de temefos (97.7% pureza, chem service. N-10996) de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que producirán mortalidades del 10 al 90 %.
- B) Cis-Permetrina (3-fenoxifenil) metil (1R, 3R) -3- (2,2-dicloroetenil) -2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato
Una solución stock diluida en etanol (25mg/ml) se preparó a partir de permetrina (97.17% pureza, chem service. N-11483) de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que producirán mortalidades del 10 al 90 %.

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron siguiendo la metodología propuesta por la OMS (2016):

Bioensayo Dosis Respuesta y Dosis Diagnostico.

Se utilizaron recipientes con capacidad 100/150 ml, se agregó 99 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de insecticida, donde posteriormente se colocaron 20 larvas de estadio III tardío o IV temprano. Así mismo se incluyó un control con 99 ml de agua destilada más 1 ml de etanol. Cada concentración se realizó por triplicada, el tiempo de exposición fue de 24 horas y criterio de mortalidad fue el no movimiento de las larvas o la adherencia de ellas en la superficie de los vasos.

Análisis de datos.

Los datos se analizaron en el programa IBM SPSS Statistics Provit (Versión 24, 2016) el cual se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) y la concentración letal 99 (CL₉₉), los

intervalos de confianza con una $P = 0.05$, posteriormente se determinó la dosis diagnóstico (DD), la cual se calculó multiplicando la CL_{99} por 2 y así se obtuvo la dosis diagnóstico (Flores, 2014).

La Dosis Diagnostico en temefos es descrita (OMS, 1998) la cual es de 0.0125 ppm.

Razón de resistencia.

La razón de resistencia se determinó utilizando los parámetros establecidos por Mazarri y Georghio, 1995, en el cual consiste en realizar la división de CL_{50} de la población bajo estudio entre el valor obtenido en la cepa susceptible (New Orleans), así mismo de igual manera con los valores de CL_{99} obtenidos. Los resultados indican, que, si la RR es menor a 5, la población es susceptible, mayor o igual a 5, tolerante y si es mayor a 10, la población es considerada como resistente

Determinación de microbiota.

Posteriormente después del bioensayo de dosis diagnóstico (DD) con temefos y cis-permetrina en larvas, se procedió a separar en 4 grupos, resistentes (vivos), susceptibles (muertos) y no expuestos (Cepa New Orleans) en medio inocuo y por último exclusivamente larvas de campo, se colocaron 100 larvas en los tubos de lisis ZR BashingBead™, hasta obtener el triplicado.

Table 3. Muestras procesadas para extracción de microbiota

Guadalupe en medio inocuo				New Orleans en medio inocuo	Campo
Cis-Permetrina		Temefos		(NO) 300 larvas	(CA) 300 larvas
Vivos (CPV)	Muertos (CPM)	Vivos (TV)	Muertos (TM)		
300 larvas	300 larvas	300 larvas	300 larvas		

Extracción de ADN

1. Agregar la muestra a los tubos de lisis ZR BashingBead™ (0.1 y 0.5 mm), junto con ello agregar 750 µl de solución de lisis ZymoBIOMICS™ al tubo.
2. Colocar en el homogenizador el tubo de 2 ml y llevar a la velocidad máxima durante 5 minutos.
3. Centrifugar los tubos de lisis ZR BashingBead™ (0.1 y 0.5 mm) en la microcentrífuga a 10,00 g durante 1 minuto.
4. Transferir 400 µl de sobrenadante al filtro Zymo-Spin™ III-F en un tubo de recolección y centrifugar a 8,000 g durante 1 minuto. Deseche el filtro Zymo-Spin™ III-F.
5. Agregar 1,200 µl del Buffer de unión Zymo Biomics™ DNA para filtrar en el tubo colector del paso 4.

6. Transferir 800 µl de la mezcla del paso 5 a una columna de IICR Zymo-Spin™ a un tubo colector y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
7. Descartar el sobrenadante del tubo colector y repetir el paso número 6.
8. Agregar 400 µl del Buffer de lavado de DNA Zymo Biomics a un nuevo tubo colector, centrifugar a 10,000 g por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
9. Agregar 700 µl Buffer de lavado 2 Zymo Biomics DNA Wash y centrifugar a 10,000 g por 1 minuto. Descartar el sobrenadante.
10. Agregar 200 µl Buffer de lavado 2 Zymo Biomics DNA Wash al mismo tubo y centrifugar a 10,000 g por 1 minuto.
11. Colocar la columna en un tubo de 1.5 y agregar 100 µl de Agua DNAsa/Rnasa, incubar por 1 minuto y centrifugar a 10,000 g por 1 minuto.
12. Colocar un filtro HRC Filter Zymo-Spin™ en un tubo colector y agregar 600 µl de la solución de preparación de preparación HRC y centrifugar a 8,000 g por 3 minutos.
13. Transferir el DNA eluido del paso 11 al filtro preparado del paso 12 y colocar en un tubo de 1.5 ml. Se centrifugo a 10,000 g por 3 minutos.

El DNA es viable para realizar PCR.

PCR

Sección 1: Amplificación de secuencia dirigida

1. Configure una mezcla maestra de acuerdo con los volúmenes de componentes en la tabla a continuación:

Componente	Volumen/Reacción
Quick-16S™ qPCR Premix	10 µl
Quick-16S™ Primer Set V3-V4	4 µl
ZymoBIOMICS® DNase/RNase Free Water	4 µl
Total 18 µl	Total 18 µl

2. Agregue 18 µl de la mezcla maestra a cada pocillo de una placa en tiempo real de 96 pocillos etiquetada como “Placa dirigida”. Puede encontrar una muestra de la configuración de la placa en la página 3.
3. Agregue 2 µl de sus muestras de DNA a pozos individuales. Incluya un control positivo y negativo en la placa. El estándar de DNA de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS® (incluido en este kit) debe usarse como control positivo.
4. Aplique un adhesivo para el sello de la placa de PCR. Mezcle la placa en un agitador de placas y colocar en la centrifuga de placas.

Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
95°C	30 seg
55°C	30 seg
72°C	3 min
Lector de placas	-
4°C	Mantener

} 20 ciclos

Título del programa recomendado: Amplificación de secuencia dirigida

5. Coloque la “Placa dirigida” en un termociclador y ejecute el programa que se muestra a continuación:

6. Una vez que las muestras se hayan enfriado a 4 ° C, detenga el programa. Centrifugue la "Placa Dirigida" en un plato giratorio para recoger la condensación en los pozos y coloque la placa en hielo. Pase a la Sección 2 de inmediato.

Sección 2: limpieza de reacción

1. Agregue 1 µl de Solución de Limpieza de Reacción a cada pocillo de reacción en la “Placa Dirigida” de la Sección 1.

2. Aplique el sello adhesivo de la placa de PCR. Mezcle la placa en un agitador de placas y centrifugue en un plato giratorio.

3. Coloque la placa en un termociclador en tiempo real y ejecute el programa que se muestra a continuación:

Temperatura	Tiempo
37°C	15 min
95°C	10 seg
4°C	Mantener

Título del programa recomendado: Limpieza de reacción

4. Una vez que las muestras se hayan enfriado a 4 ° C, detenga el programa. Centrifugue la placa en un plato giratorio para recoger la condensación en los pozos y coloque la placa en hielo. Pase a la Sección 3, o almacene la placa a ≤ -20 ° C si es necesario para su uso posterior.

Sección 3: Adición de código de barras

1. Configure una mezcla maestra de acuerdo con los volúmenes de componentes en la tabla a continuación:

2. Agregue 14 µl de la mezcla maestra a cada pocillo de una nueva placa de PCR en tiempo real de 96 pocillos etiquetada como “Placa con código de barras”.

3. Desde el Index Primer Set A, agregue 2 µl del Index Primer ZA7xx y 2 µl del Index Primer ZA5xx a los pocillos adecuados como se indica en el siguiente diagrama

		Index Primers ZA7xx												
		ZA701	ZA702	ZA703	ZA704	ZA705	ZA706	ZA707	ZA708	ZA709	ZA710	ZA711	ZA712	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Index Primers ZA5xx	ZA501	A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
	ZA502	B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
	ZA503	C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
	ZA504	D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92
	ZA505	E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S93
	ZA506	F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S94
	ZA507	G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	POS*
	ZA508	H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NEG**

POS: El estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS® debe usarse como control positivo.

NEG: Un control sin plantilla debe usarse como control negativo.

4. Mezcle por pipeteo y transfiera 2 µl de las muestras de DNA de la “Placa dirigida” recolectada al final de la Sección 2 a los pocillos correspondientes de la “Placa con código de barras”.

5. Aplique un adhesivo para el sello de la placa de PCR. Mezcle en la centrifuga de placas y centrifúguelo en la centrifuga de placas.

6. Coloque "Placa con código de barras" en un termociclador en tiempo real y ejecute el programa que se muestra a continuación:

Temperatura	Tiempo	} 5 ciclos
95°C	15 min	
95°C	30 seg	
55°C	30 seg	
72°C	3 min	
Lector de placas	-	
4°C	Mantener	

7. Control de calidad de la muestra: Examine la curva de amplificación de cada muestra para confirmar que cada reacción se comporta razonablemente.

8. Mantenga "Placa con código de barras" en el termociclador en tiempo real y ejecute el programa que se muestra a continuación:

Temperatura	Tiempo
72°C	2 min
Lector de placas	-
4°C	Mantener

Título del programa recomendado: Lectura de placa

9. Registre y guarde la lectura de fluorescencia de cada reacción del programa "Lectura de placa" para la cuantificación de la biblioteca en la Sección 4. Continúe con la Sección 4, o almacene la placa a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ si es necesario para su uso posterior.

Sección 4: Cuantificación y agrupación de bibliotecas

Los pasos 1-4 a continuación son para crear una curva estándar de fluorescencia. Estas mediciones para un sistema de PCR en tiempo real deben ser estables durante al menos 3 meses.

1. A una nueva placa de PCR en tiempo real de 96 pocillos etiquetada como "Placa de estándares", agregue 20 μl de cada Estándar de fluorescencia (1-4), por triplicado, a los pocillos individuales como se indica a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C					Fluorescence Standard 1							
D					Fluorescence Standard 2							
E					Fluorescence Standard 3							
F					Fluorescence Standard 4							
G												
H												

2. Aplique el sello adhesivo de la placa de PCR.

3. Coloque "Placa de estándares" en el mismo termociclador en tiempo real que se utiliza para "Placa con código de barras" en la Sección 3 y ejecute el programa que se muestra a continuación:

Temperatura	Tiempo
72°C	2 min
Lector de placas	-
4°C	1 min

Título del programa recomendado: Lectura de placa de estándares de fluorescencia

4. Registre y guarde la lectura de fluorescencia de cada reacción del programa "Fluorescence Standards Plate Read" para la cuantificación de la biblioteca.

5. Descargue el archivo de la plantilla de cuantificación y agrupación de bibliotecas haciendo clic aquí (solo EE. UU.) O visitando la sección de documentación de la página del producto D6400 en www.zymoresearch.com.

6. Ingrese los valores del programa "Lectura de placa de estándares de fluorescencia" (Sección 4, Paso 4) en las posiciones apropiadas en la Tabla 1 del archivo.

7. Ingrese los valores obtenidos del programa "Plate Read" (Sección 3, Paso 9) en las posiciones apropiadas en la Tabla 3 del archivo.

8. Ingrese la cantidad deseada de producto para cada muestra que le gustaría usar para la normalización (por ejemplo, 30 ng) en las posiciones apropiadas en la Tabla 5 del archivo. La Tabla 6 calculará el volumen requerido de cada muestra para la normalización.

9. Coloque un nuevo tubo de microcentrífuga en hielo. Agrupe el volumen requerido de cada muestra de la "Placa con código de barras" en el tubo de microcentrífuga. Pase a la Sección 5 inmediatamente.

Sección 5: Limpieza final de la biblioteca

1. Resuspenda las partículas magnéticas de los MagBeads Select-a-Size agitándolas vigorosamente hasta que estén homogéneas.

2. Agregue 0.8 x volumen de la biblioteca agrupada de MagBeads Select-a-Size a la biblioteca agrupada de la Sección 4. Use los valores que se encuentran en la Tabla 7 en la Plantilla de cuantificación y agrupación de bibliotecas. Por ejemplo, agregue 80 µl de MagBeads Select-a-Size a 100 µl de biblioteca agrupada.

3. Mezcle bien pipeteando o agitando hasta que quede homogéneo. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Coloque la muestra en una rejilla magnética e incube durante 3-10 minutos a temperatura ambiente, o hasta que las perlas magnéticas se hayan separado completamente de la solución.

5. Una vez que las cuentas se hayan despejado de la solución, retire y deseche el sobrenadante.

6. Mientras las cuentas todavía están en la rejilla magnética, agregue 200 µl de DNA Wash Buffer. Retire y deseche el sobrenadante. Repita este paso.

7. Mientras las cuentas todavía están en la rejilla magnética, aspire cualquier tampón residual con una punta de pipeta de 10 µl.

8. Retire la muestra de la rejilla magnética. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente para eliminar todo rastro de tampón.

9. Agregue 10-20 µl de ZymoBIOMICS® DNase / RNase Free Water a las cuentas y mezcle bien la pipeta. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

10. Coloque la muestra en una rejilla magnética durante 1 minuto para separar las perlas magnéticas de la elusión.

11. Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga.

El ADN de la biblioteca agrupada ultra pura ahora está listo para su uso.

Secuenciación.

La biblioteca final se secuenció en Illumina® MiSeq™ con un kit de reactivos v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con >10% PhiX spike-in.

Análisis Bioinformático.

Las secuencias de amplificación únicas se infirieron de lecturas sin procesar utilizando la canalización Dada2 (Callahan et al., 2016). Las secuencias quiméricas también fueron eliminadas con el oleoducto Dada2. La visualización de la composición de los análisis de la diversidad alfa se realizó con Qiime v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010). Si aplicaba, la taxonomía que tiene una abundancia significativa entre los diferentes grupos fue identificada por LEfSe (Segata et al., 2011) utilizando la configuración predeterminada. Otros análisis y gráficas de abundancia se realizaron con scripts internos en R (<https://cran.r-project.org/>). Sólo aquellas lecturas con más del 1% de la proporción del 99.2% fueron tomados en cuenta.

Análisis Estadístico.

Índices de diversidad alfa

Índice de Shannon-Wiener

Mide el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar provenientes de una comunidad ‘extensa’ de la que se conoce el número total de especies S . Este índice se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad y superiores a 3 son altos en diversidad de especies.

Formula:

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

S : Número de especies (la riqueza de especies).

p_i : Proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (la abundancia relativa de la especie i): $\frac{n_i}{N}$

n_i : Número de individuos de la especie i

N : Número de todos los individuos de todas las especies

De esta forma, el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia).

Índice de Simpson

El índice de Simpson se deriva de la teoría de probabilidades, y mide la probabilidad de encontrar dos individuos de la misma especie en dos ‘extracciones’ sucesivas al azar sin ‘reposición’. S_iD = índice de diversidad de Simpson que indica la probabilidad de encontrar dos individuos de especies diferentes en dos ‘extracciones’ sucesivas al azar sin ‘reposición’. Este índice les da un peso mayor a las especies abundantes subestimando las especies raras, tomando valores entre ‘0’ (baja diversidad) hasta un máximo de $[1 - 1/S]$.

Formula:

$$D'_{si} = \sum_{i=1}^s \frac{ni(ni - 1)}{n(n - 1)}$$

S = es el número de especies

ni = es el número de individuos de la especie i

Índice de Fisher

Es un índice paramétrico que supone que la abundancia de especies sigue una distribución logística. Se consideraron necesarios los análisis de diversidad con este parámetro, considerando que los índices de diversidad de Shannon y de Simpson dependen mayormente del número de las especies más comunes, por lo que puede enmascarar la importancia de las especies raras.

Formula:

$$S = \alpha \text{ Loge } (1 + N/\alpha)$$

S = número de especies de la muestra

N = número de individuos en la muestra

α = coeficiente de diversidad

Índice de Chao1

Es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Chao, 1984). S es el número de especies en una muestra, a es el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de “singletons”) y b es el número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra (número de “doubletons”, Colwell, 1997; Colwell y Coddington, 1994).

Formula:

$$Chao1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Prueba de t (Hutcheson, 1970)

Se aplicó la prueba de t de (Hutcheson, 1970), para determinar si existía diferencia significativa entre los 6 tratamientos a nivel especie (Tabla 4).

Formula:

$$T = \frac{H'_1 - H'_2}{(\text{Var } H'_1 + \text{Var } H'_2)}$$

Table 4. Comparativo de los 6 tratamientos a nivel especie con T de Hutchenson

X	$T_{1,2}$	$T_{1,3}$	$T_{1,4}$	$T_{1,5}$	$T_{1,6}$
$P_{1,2}$	X	$T_{2,3}$	$T_{2,4}$	$T_{2,5}$	$T_{2,6}$
$P_{1,3}$	$P_{2,3}$	X	$T_{3,4}$	$T_{3,5}$	$T_{3,6}$
$P_{1,4}$	$P_{2,4}$	$P_{3,4}$	X	$T_{4,5}$	$T_{4,6}$
$P_{1,5}$	$P_{2,5}$	$P_{3,5}$	$P_{4,5}$	X	$T_{5,6}$
$P_{1,6}$	$P_{2,6}$	$P_{3,6}$	$P_{4,6}$	$P_{5,6}$	X

P1: Temefos vivos, P2: Temefos muertos, P3: Cis-permetrina vivos, P4: Cis-permetrina muertos, P5: New Orleans, P6: Campo

Índice de diversidad beta

Índice de Bray Curtis

El análisis de agrupamiento jerárquico parte de una matriz de similitud que permite detectar el grado de similitud entre las unidades. Para medir los similares (o disimilares), que son las unidades. El índice de Bray–Curtis que se considera como una medida de la diferencia entre las abundancias de cada especie presente (Brower y Zar, 1984), y se expresa mediante:

Formula:

$$I_{BC} = 1 - \frac{\sum(x_i - y_i)}{\sum(x_i + y_i)}$$

NOTA:

Tanto la PCR tiempo real, análisis de secuenciación y bioinformático, fue llevado a cabo por el laboratorio ZYMO RESEARCH, ubicado en 17062 Murphy Ave. Irvine, CA 92614, EUA.

RESULTADOS

Determinación de la susceptibilidad al organofosforado temefos y al piretroide cis-permetrina.

Se determino el nivel de susceptibilidad a los insecticidas organofosforado (temefos) y el piretroide (cis-permetrina) en 2 poblaciones de *Ae. aegypti*, una población de campo colectada en Guadalupe N.L., y una población susceptible (NO). Los resultados de mortalidad de CL₅₀ y CL₉₉ y factores de resistencia se presentan en la tabla 4. La respuesta de la población de Guadalupe a temefos fue de una resistencia moderada, mientras que para el insecticida cis-permetrina mostro alta resistencia, con base a los valores establecidos de Mazarri y Georhio, 1995.

Table 5. Dosis respuesta, dosis diagnóstico y razón de resistencia en larvas de *Ae. aegypti* expuestos a temefos y cis-permetrina

Temefos					
Población	CL ₅₀ (ppm) LC	CL ₉₉ (ppm) LC	DD (ppm)	RR CL ₅₀	RR CL ₉₉
New Orleans	0.003 (0.003-0.004)	0.012 (0.009-0.019)	0.0125	×	×
Guadalupe	0.022 (0.019-0.026)	0.114 (0.080-0.207)	×	7.33	9.5
Cis-permetrina					
Población	CL ₅₀ (ppm) LC	CL ₉₉ (ppm) LC	DD (ppm)	RR CL ₅₀	RR CL ₉₉
New Orleans	0.001 (0.001-0.002)	0.067 (0.031-0.220)	0.134	×	×
Guadalupe	0.071 (0.056-0.091)	3.882 (1.841-12.343)	×	71	57.94

LC: Limite de confianza, DD: Dosis diagnóstico y RR: Razón de resistencia.

Comunidades microbianas de larvas a nivel phylum de *Ae. aegypti*

Un total de 18 muestras, divididas en 6 grupos, los cuales son: temefos vivos (TV), temefos muertos (TM), cis-permetrina vivos (CPV), cis-permetrina muertos (CPM), New Orleans (NO) y campo (CA) fueron procesadas, estas fueron generadas a partir de larvas de mosquitos de *Ae. aegypti*. El phylum con mayor abundancia en los 6 tratamientos procesados fue Proteobacteria con 66.4%, así mismo el segundo phylum fue Bacteroidetes con 19.8%, el tercer phylum con mayor abundancia fue Actinobacteria con 11.4%, los phylum con menor abundancia fueron Firmicutes con 0.6%, Chloroflexi con 0.5% y Otros con 0.7%. Con las larvas expuestas al insecticida temefos se presentaron los mismos phylums tanto en vivos como en muertos, pero si se determinó un cambio en la abundancia (Figura 6a y 6b), este mismo resultado se presentó con el tratamiento del insecticida cis-permetrina (Figura 7a y 7b). En el tratamiento de campo se determinó un mayor número de phylums (7) (Figura 8a), a diferencia del tratamiento New Orleans que presento 3 solamente (Figura 8b).

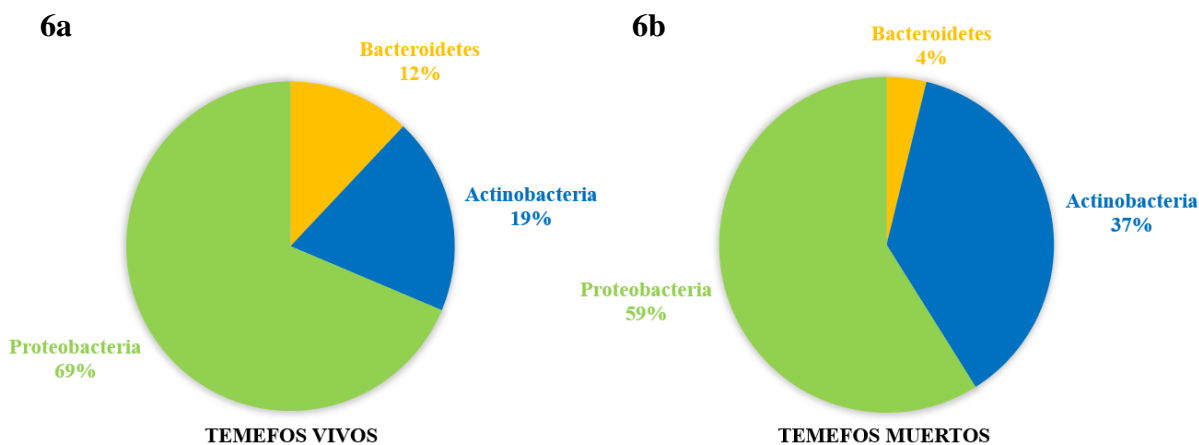


Figura 6. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos y muertos en larvas de *Ae. aegypti*.

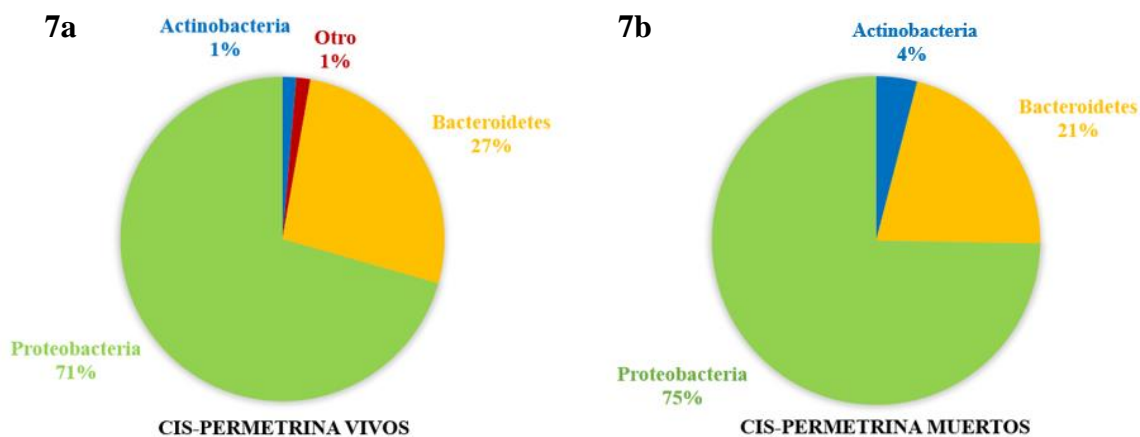


Figura 7. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos y muertos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel phylum.

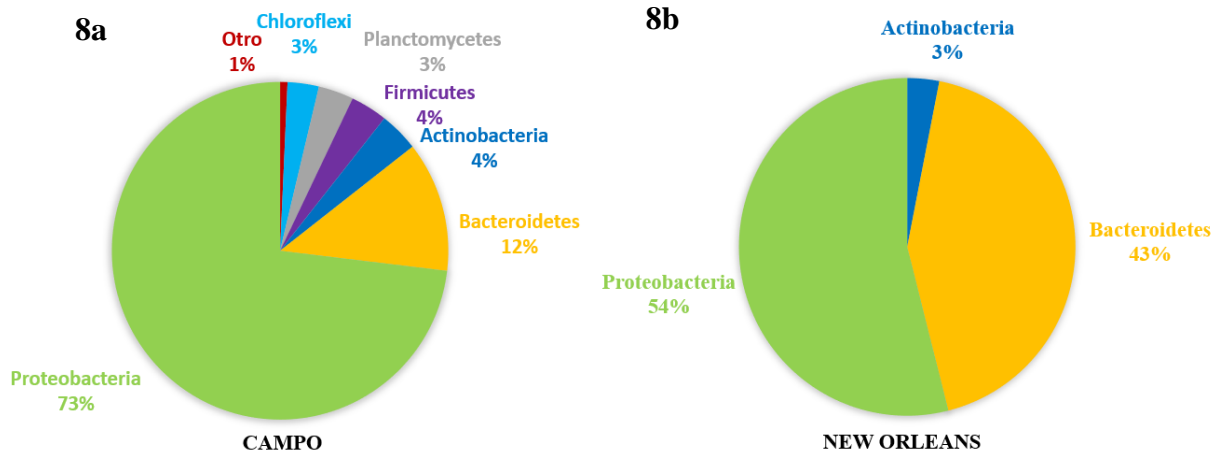


Figura 8. Composición bacteriana del tratamiento de campo y el tratamiento de New Orleans en larvas de *Ae. aegypti* a nivel phylum.

Comunidades microbianas de larvas a nivel familia de *Ae. aegypti*

En el mapa de calor (Figura 9) se representa la abundancia de las comunidades bacterianas presentes en los 6 tratamientos a nivel familia en larvas de *Ae. aegypti*.

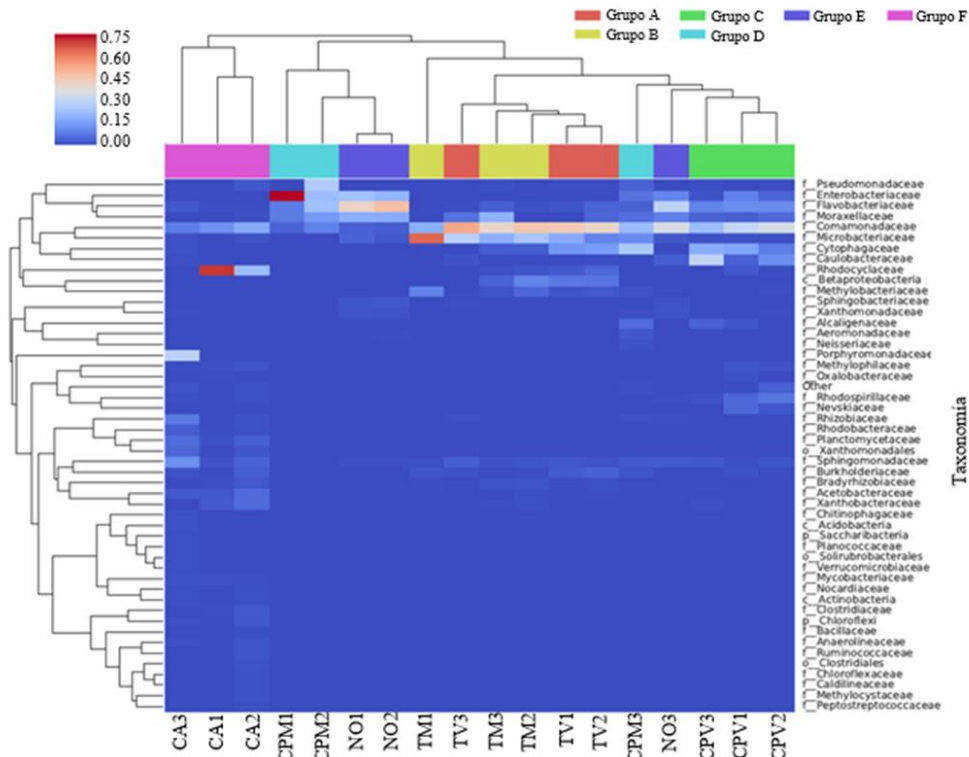


Figura 9. Mapa de calor de abundancia taxonómica a nivel familia de los 6 tratamientos.

En el tratamiento temefos vivos se obtuvieron 23 familias, las cuales las que presentan mayor abundancia son Comamonadaceae con 48.33%, Microbacteriaceae con 19.23% y

Cytophagaceae con 9.67%, el resto de las bacterias son menos del 5% del total de bacterias encontradas (Figura 10).

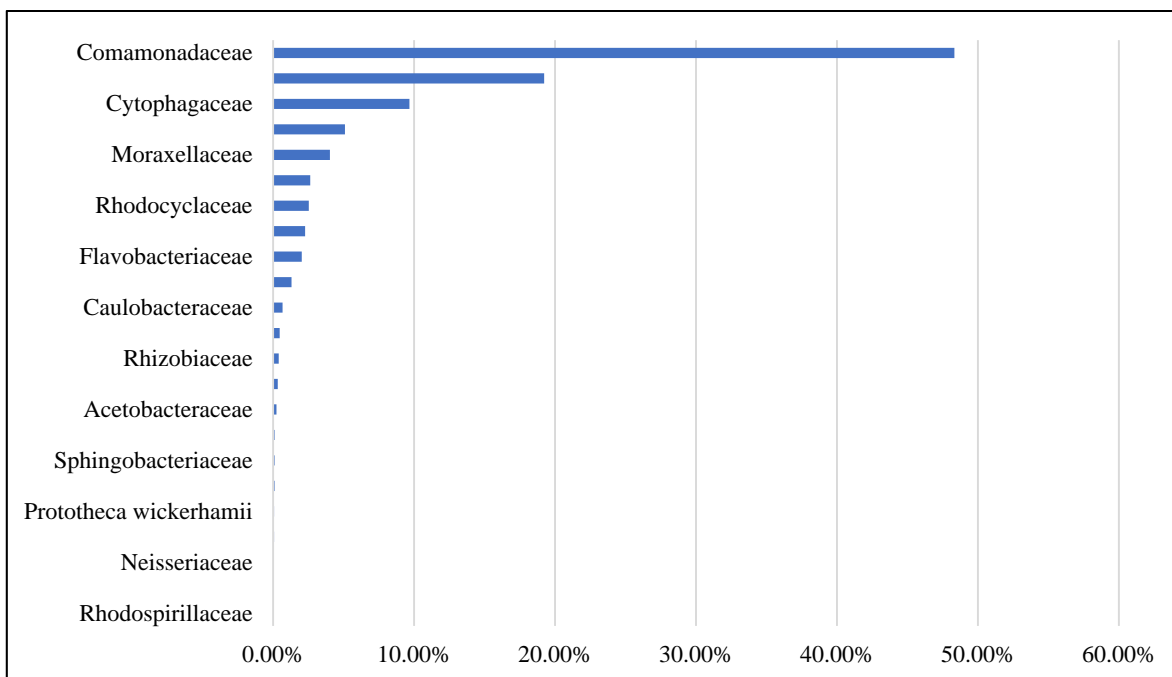


Figura 10. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel familia.

En el tratamiento de temefos muertos se obtuvieron 19 familias de bacterias, las que presentaron mayor abundancia son Microbacteriaceae con 37.17%, Comamonadaceae con 36.63%, Moraxellaceae con 6.83%, Methylobacteriaceae con 5.53%, el resto de bacterias determinadas representan menos del 5% del total de bacterias encontradas (Figura 11).

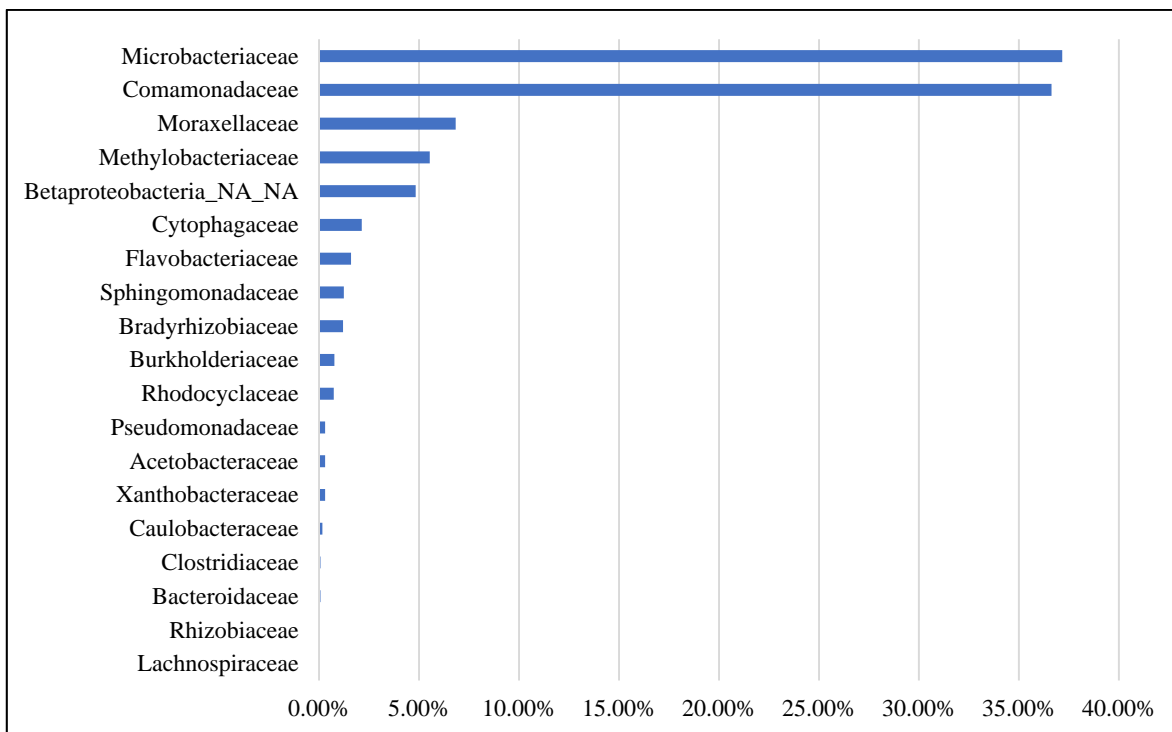


Figura 11. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos muertos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel familia.

En el tratamiento de cis-permetrina vivos, se determinaron 32 familias, dentro de las cuales las que presentaron mayor abundancia son Comamonadaceae con 30.33%, Caulobacteraceae con 15.70%, Cytophagaceae con 15.00%, Flavobacteriaceae con 11.27% y Enterobacteriaceae con 5.17%, el resto de las bacterias representan menos del 5% (Figura 12). Por otra parte, en el tratamiento de cis-permetrina muertos se determinaron 22 familias, dentro de las cuales las que presentaron mayor abundancia son Enterobacteriaceae con 36.00%, Flavobacteriaceae con 12.33%, Comamonadaceae con 12.23, Pseudomadaceae con 10.57%, Moraxellaceae con 9.90% y Cytophagaceae con 8.80%, el resto de las bacterias representan solo el 5% (Figura 13).

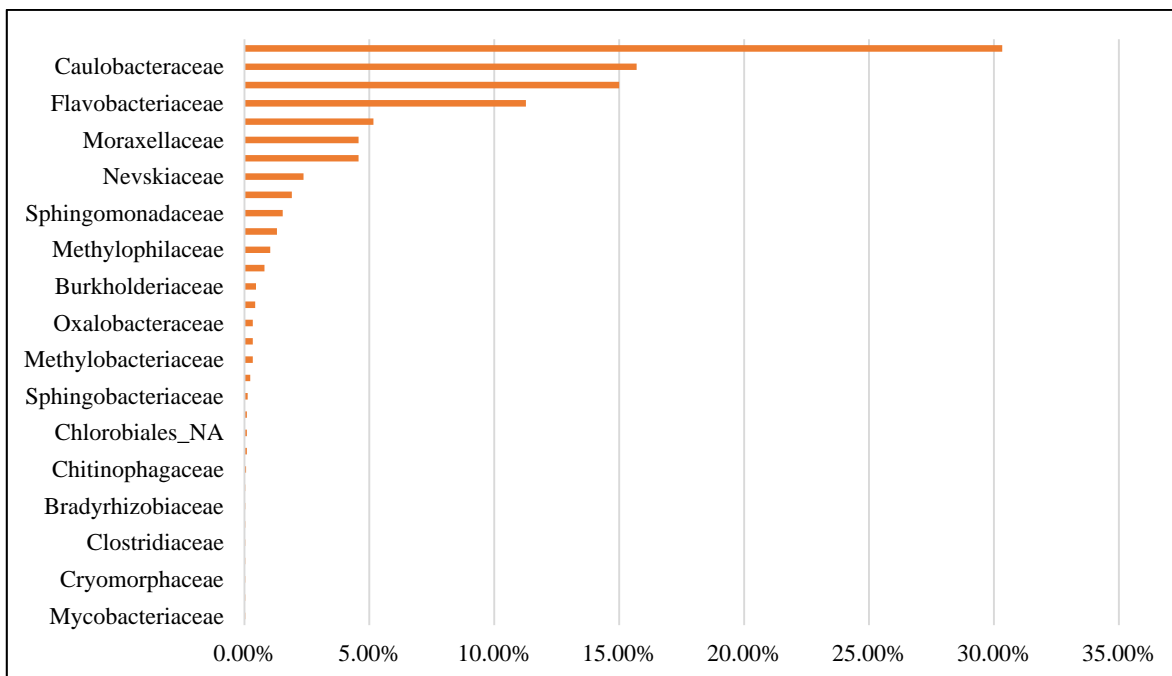


Figura 12. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel familia.

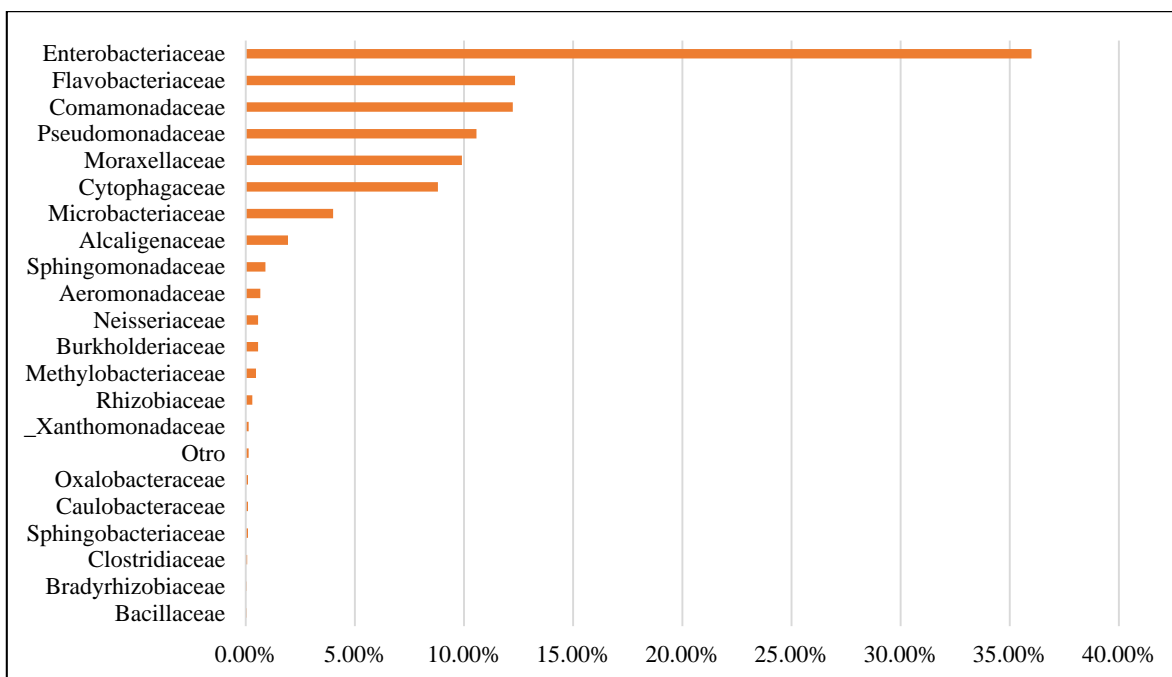


Figura 13. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina muertos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel familia.

En el tratamiento New Orleans fueron determinadas 18 familias, las bacterias con mayor abundancia fueron Flavobacteriaceae con 41.30%, Enterobacteriaceae con 18.57%, Moraxellaceae con 15.77%, Comamonadaceae con 14.73%, el resto de las bacterias representan menos del 5% (Figura 14).

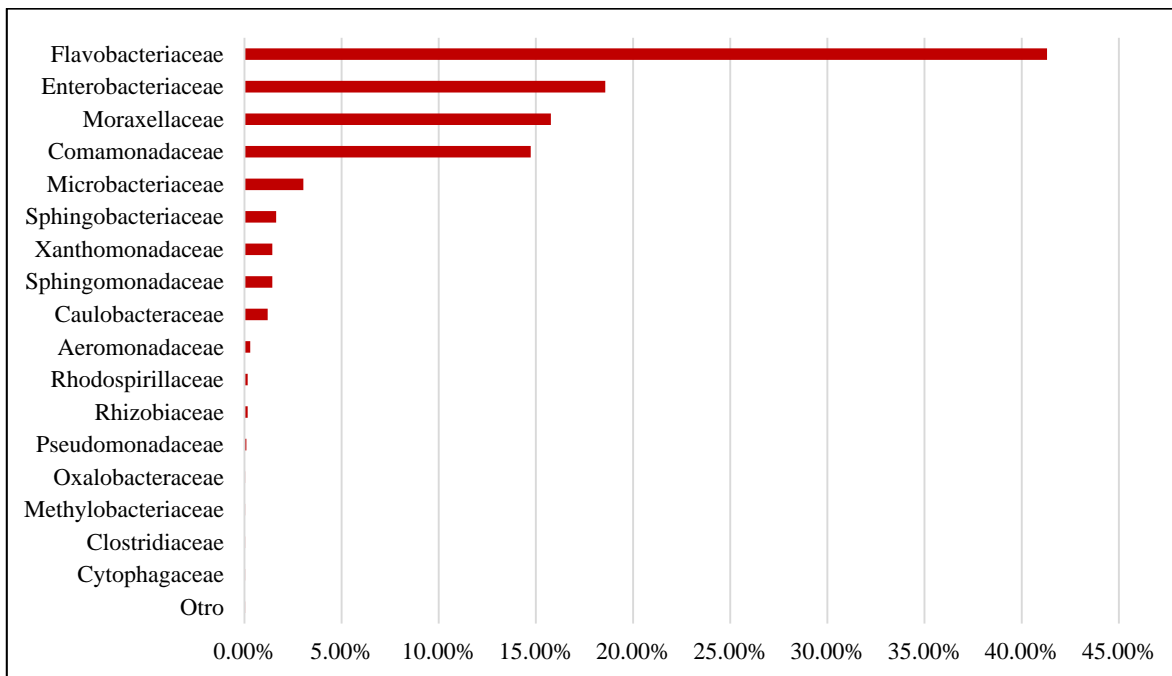


Figura 14. Composición bacteriana del tratamiento de New Orleans a nivel familia.

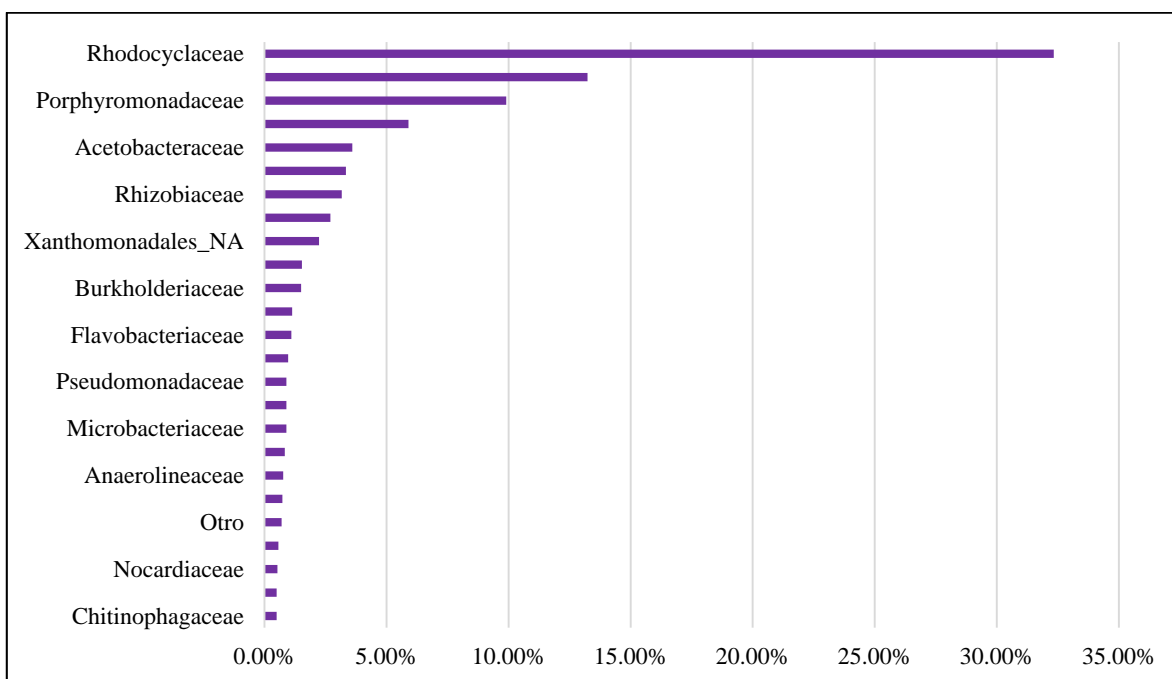


Figura 15. Composición bacteriana del tratamiento de campo a nivel familia.

Para el tratamiento de campo fueron determinadas 90 familias, las que mayor abundancia presentaron fueron Rhodocyclaceae con 32.33%, Comamonadaceae 13.23%, Porphyromonadaceae 9.90% y por último Sphingomadaceae con 5.90%, el resto de las familias de bacterias se encontraron en menos del 5% de la abundancia total (Figura 15).

Comunidades microbianas de larvas a nivel especie de *Ae. aegypti*.

En el mapa de calor (Figura 16) se representa la abundancia de las comunidades bacterianas presentes en los 6 tratamientos a nivel especie en larvas de *Ae. aegypti*.

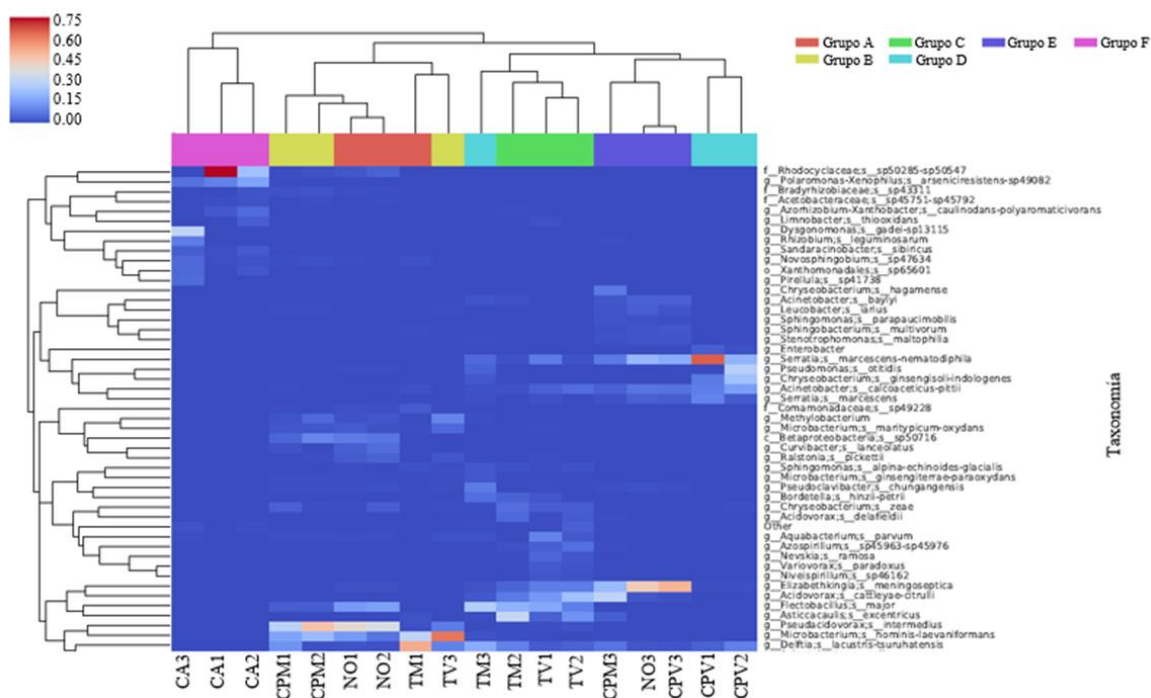


Figura16. Mapa de calor de abundancia taxonómica a nivel familia de los 6 tratamientos.

El tratamiento temefos vivos, se determinaron 60 especies de bacterias, las especies con mayor abundancia fueron *Pseudacidovorax intermedius* con 24.97%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 18.00%, *Microbacterium hominis laevaniformans* con 16.60%, *Flectobacillus major* con 9.67%, el resto de las bacterias presentan menos del 5% (Figura 17).

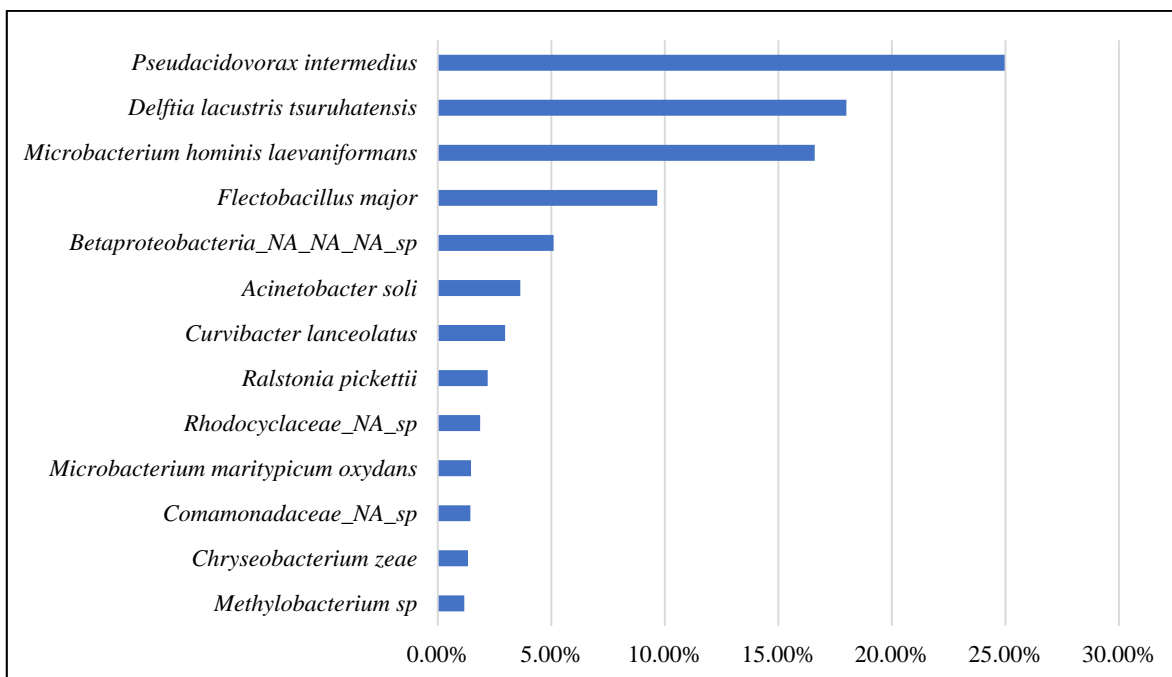


Figura 17. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos vivos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel especie.

En el tratamiento temefos muertos, fueron determinadas 52 especies de bacterias, las especies con mayor abundancia fueron *Microbacterium hominis laevaniformans* con 32.53%, *Pseudacidovorax intermedius* con 27.60%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 7.53%, *Acinetobacter soli* con 6.57% y *Methylobacterium sp* con 5.43%, el resto de las especies representan el 5% de la abundancia total (Figura 18).

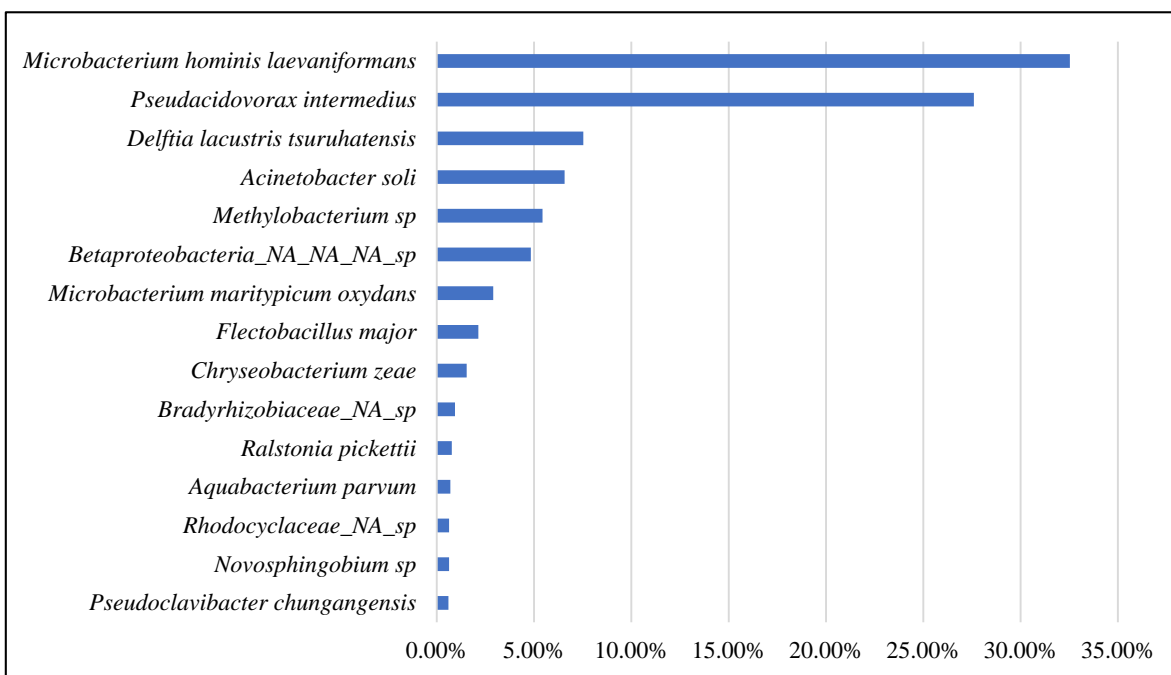


Figura 18. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida temefos muertos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel especie.

Para el tratamiento cis-permetrina vivos, fueron determinadas 88 especies de bacterias, las especies con mayor abundancia fueron *Asticcacaulis excentricus* con 15.47%, *Flectobacillus major* 14.83%, *Acidovorax cattleyae citrulli* 14.63%, *Elizabethkingia meningoseptica* con 6.97% y *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 5.30%, el resto de las bacterias representan menos del 5% (Figura 19).

En el tratamiento cis-permetrina muertos, se determinaron 53 especies de bacterias, las especies con mayor abundancia fueron *Serratia marcescens nematodiphila* con 29.50%, *Chryseobacterium ginsengisoli indologenes* con 10.90%, *Pseudomonas otitidis* con 10.50%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 10.13% y *Flectobacillus major* con 8.80%, el resto de las bacterias representan menos del 5% de la abundancia total (Figura 20).

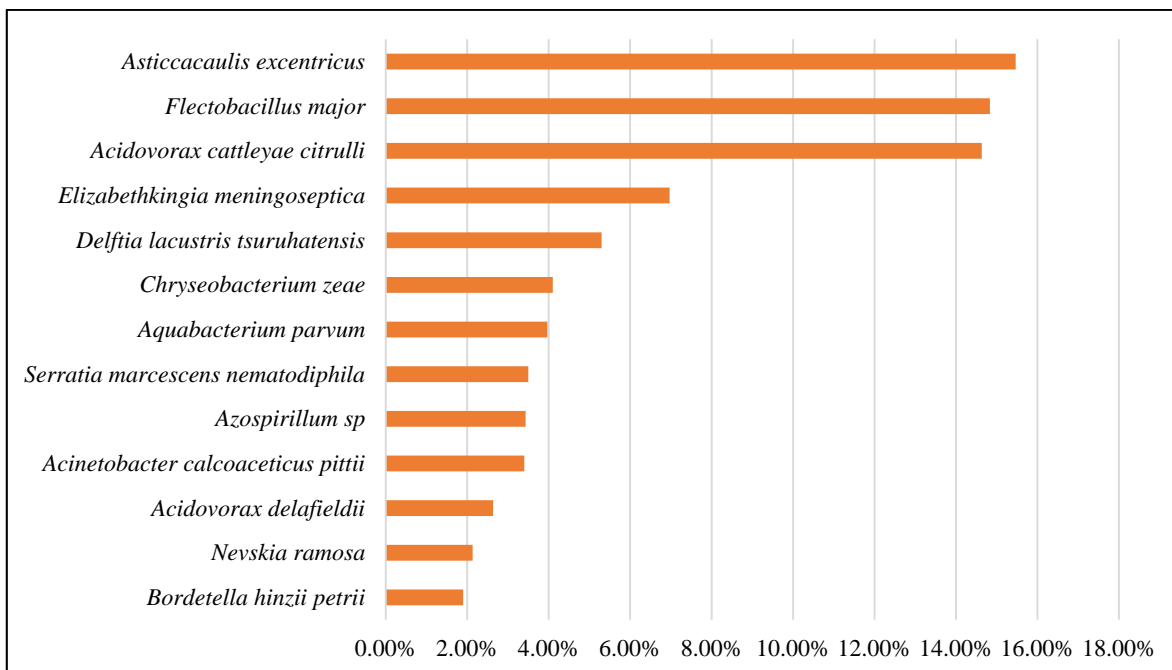


Figura 19. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina vivos en larvas de *Ae. aegypti*.

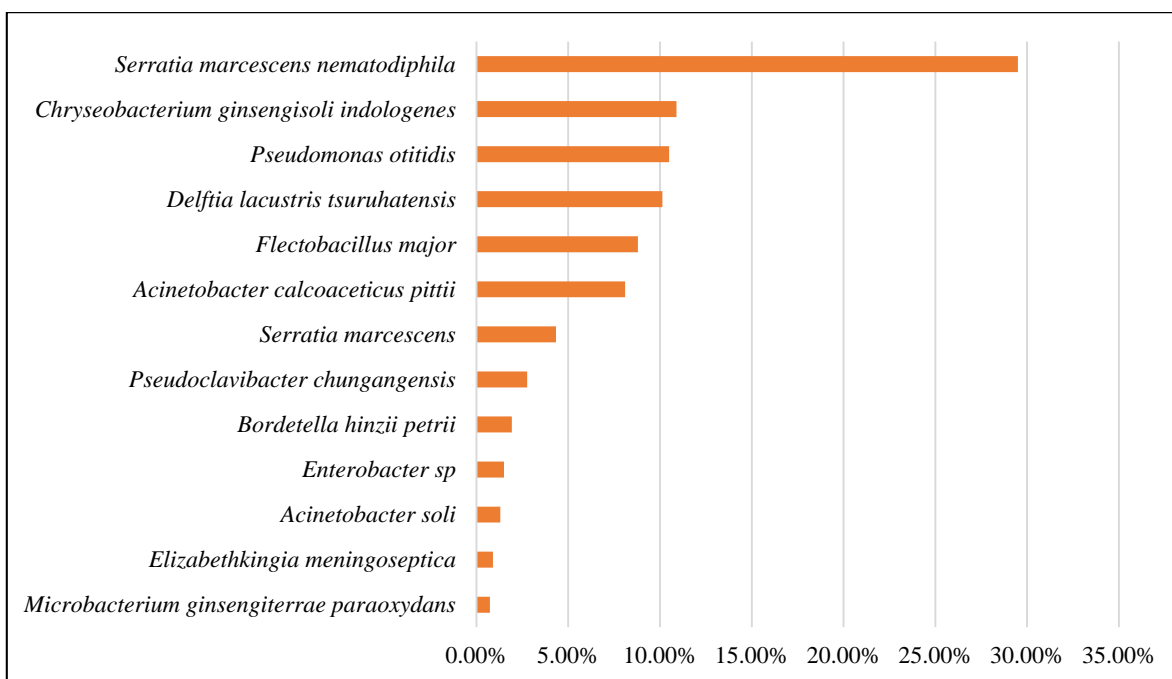


Figura 20. Composición bacteriana del tratamiento con el insecticida cis-permetrina muertos en larvas de *Ae. aegypti* a nivel especie.

En el tratamiento de New Orleans se determinaron 36 especies de bacterias, las que presentaron mayor abundancia fueron *Elizabethkingia meningoseptica* con 38.13%, *Serratia marcescens nematodiphila* con 15.17%, *Acidovorax cattleyae citrulli* con 10.80%,

Acinetobacter soli con 7.23% y *Acinetobacter calcoaceticus pittii* con 5.63%, el resto de las bacterias representan menos del 5% de la abundancia total (Figura 21).

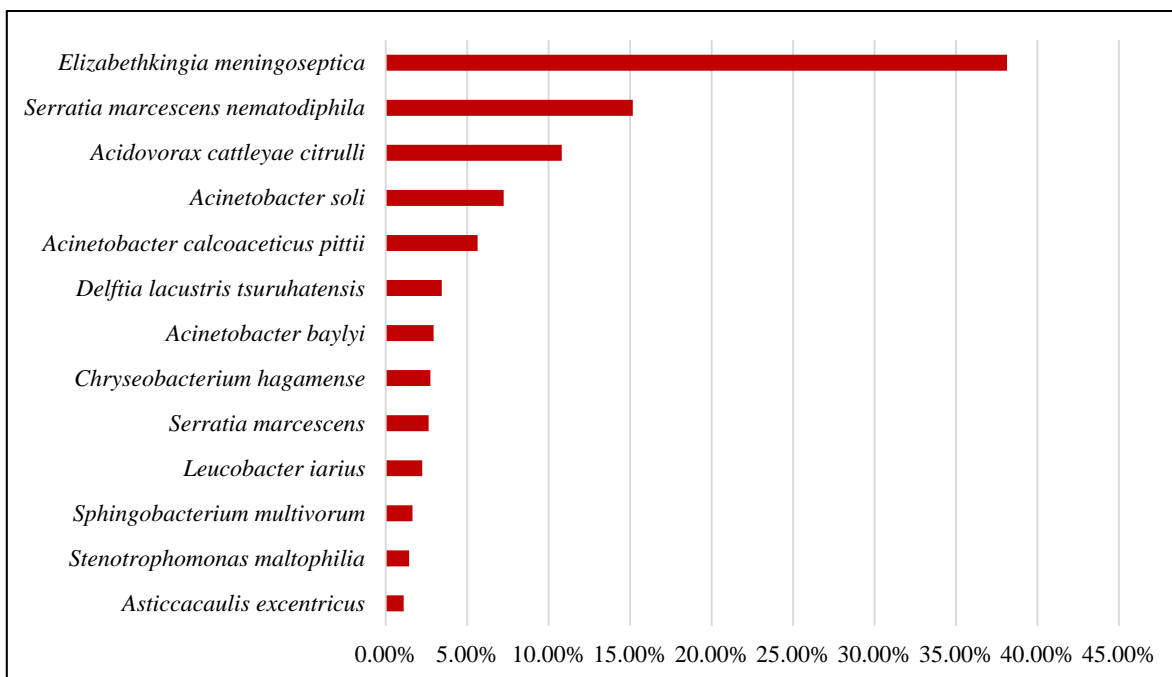


Figura 21. Composición bacteriana del tratamiento New Orleans en larvas de *Ae. aegypti* a nivel especie.

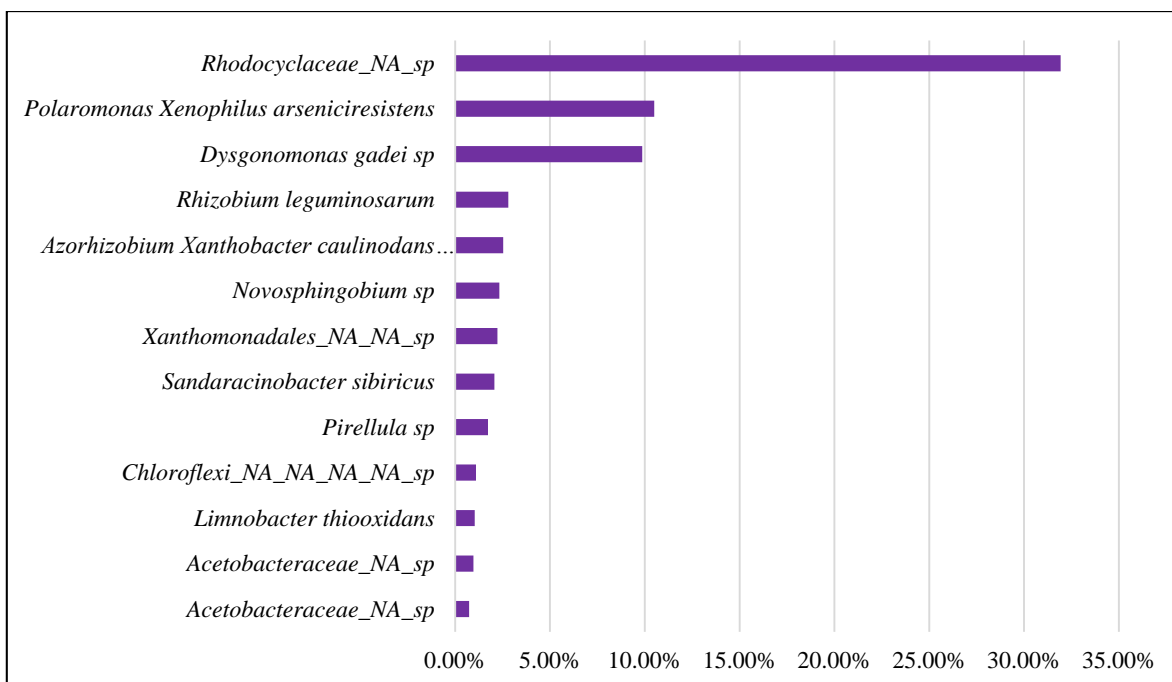


Figura 22. Composición bacteriana del tratamiento Campo en larvas de *Ae. aegypti* a nivel especie.

Por último, el tratamiento de campo se determinaron 301 especies, las que presentaron mayor abundancia son *Rhodocyclaceae_NA_sp* con 31.93%, *Polaromonas Xenophilus arseniciresistens* con 10.50% y *Dysgonomonas gadei sp* con 9.87%, el resto de las bacterias representan menos del 5% de la abundancia total (Figura 22).

Índices de diversidad alfa

Índice de Shannon-Weaver

Los resultados del índice de diversidad alfa (Shannon-Weaver), muestran que el tratamiento de campo con un valor de 4.26, presentan mayor riqueza de especies, seguido de cis-permetrina vivos con 4.18, temefos vivos con 3.1, New Orleans con 2.99, cis-permetrina muertos con 2.96 y el que presento menor riqueza es temefos muertos con 2.72 (Figura 23).

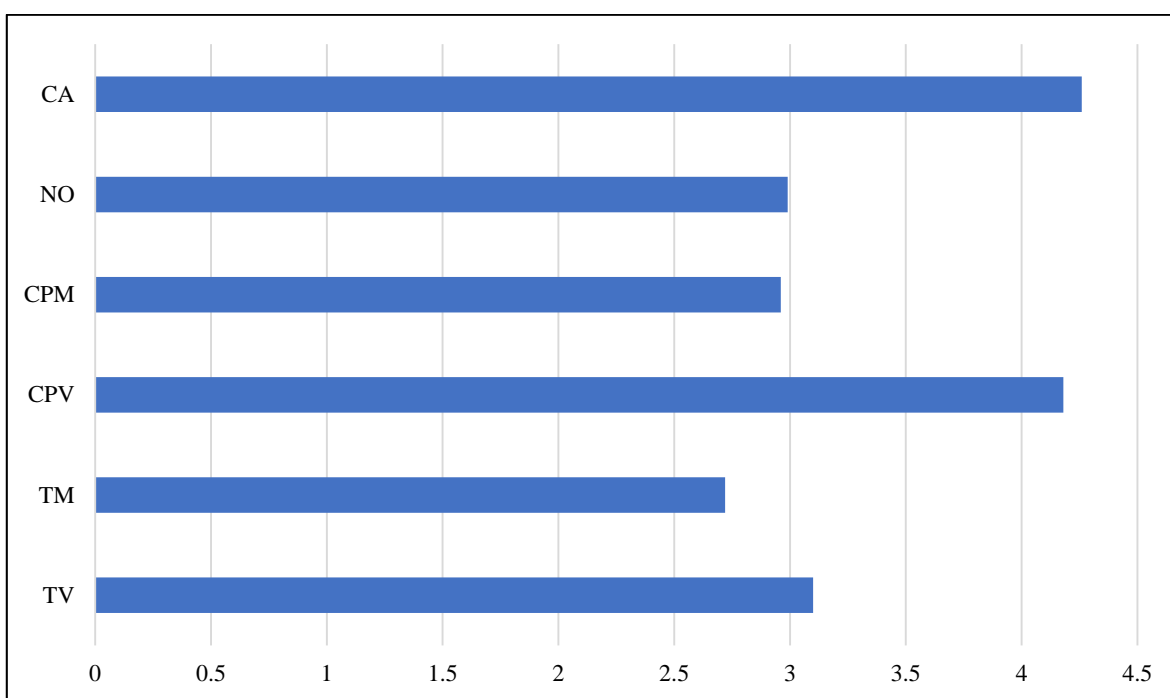


Figura 23. Diversidad alfa (Índice de Shannon) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de *Ae. aegypti*.

Índice de Simpson

Los resultados del índice de diversidad alfa (Simpson), muestran que el tratamiento temefos muertos, presento menor dominancia y mayor diversidad con 0.72, seguido de los tratamientos de campo y cis-permetrina muertos con 0.75, temefos vivos con un valor de 0.76, New Orleans con un valor de 0.77 y por último el tratamiento cis-permetrina vivos, el cual, de acuerdo con los valores establecidos con el índice de Simpson, presenta mayor dominancia y menor diversidad (Figura 24).

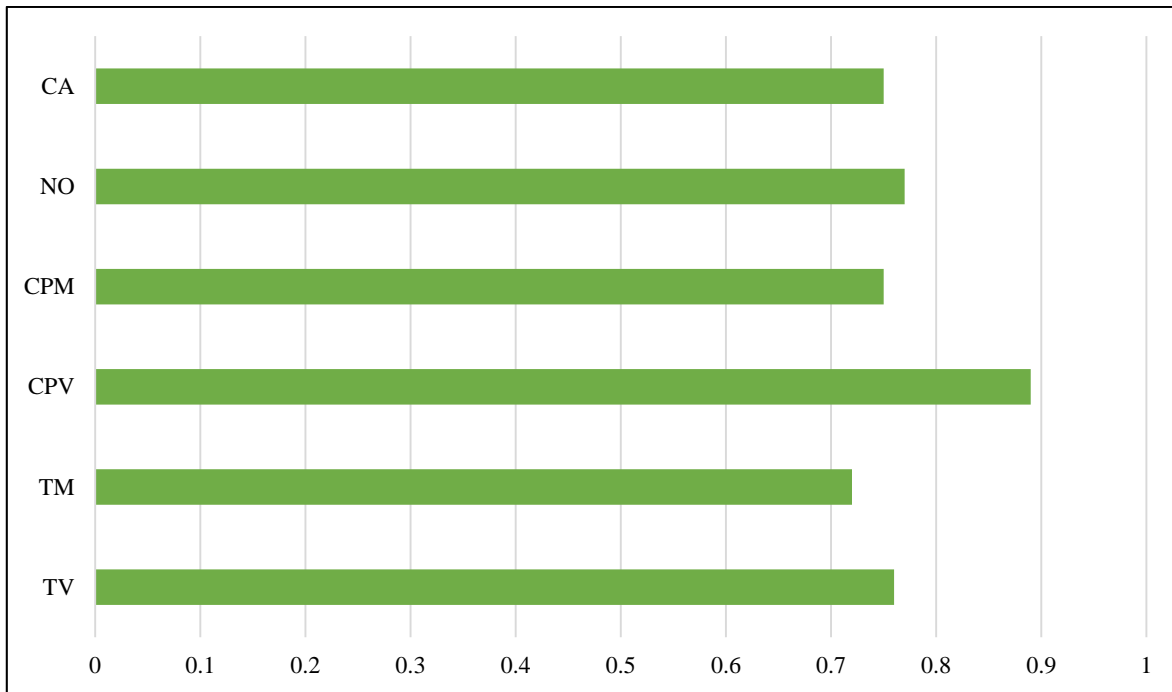


Figura 24. Diversidad alfa (Índice de Simpson) de los 6 tratamientos de estudio en larvas *Ae. aegypti*.

Índice de Fisher

Los resultados del índice de diversidad alfa (Fisher), muestran que el tratamiento de campo presento el valor mayor con 40.06, luego cis-permetrina vivos 11.37, temefos vivos con 6.91, temefos muertos con 5.61, cis-permetrina muertos con 5.3 y por último New Orleans con 4.46 (Figura 25).

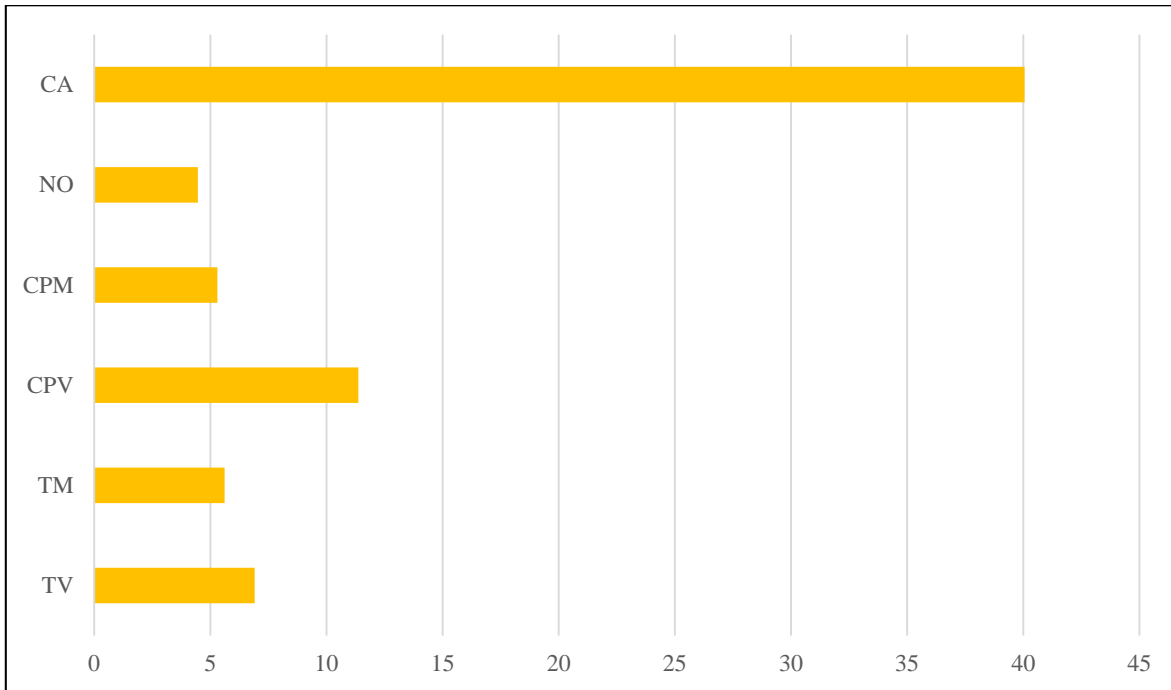


Figura 25. Diversidad alfa (Índice de Fisher) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de *Ae. aegypti*.

Índice de Chao1

Los resultados del índice de diversidad alfa (Chao1), muestran que el tratamiento de campo presenta el valor mayor entre los tratamientos con 246.67, seguido del tratamiento cis-permetrina vivos con 84.63, temefos vivos con 55, temefos muertos con 45.66, cis-permetrina muertos con 43 y por último New Orleans con 37.3 (Figura 26).

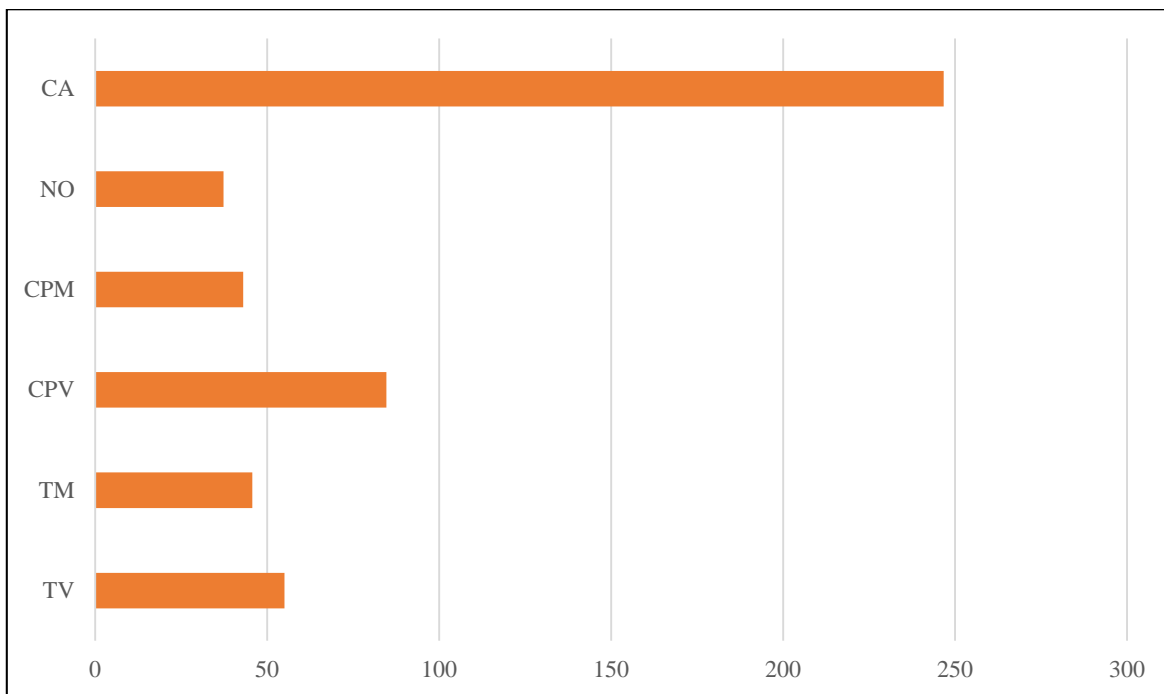


Figura 26. Diversidad alfa (Índice de Chao1) de los 6 tratamientos de estudio en larvas de *Ae. aegypti*.

Prueba de t (Hutcheson, 1970)

Se aplico la prueba de t de Hutcheson, 1970, para determinar si existía diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los 6 tratamientos a nivel especie. Dentro de los comparativos podemos mencionar que solo existe diferencia significativa entre los tratamientos temefos vivos con cis-permetrina muertos el resto de las comparaciones no presentaron diferencia (Tabla 6).

Tabla 6. Comparativo de los 6 tratamientos a nivel especie con T de Hutchenson ($P < 0.05$)

X	T _{1,2}	T _{1,3}	T _{1,4}	T _{1,5}	T _{1,6}
P _{1,2} 0.17284	X	T _{2,3}	T _{2,4}	T _{2,5}	T _{2,6}
P _{1,3} 0.27042	P _{2,3} 0.1911	X	T _{3,4}	T _{3,5}	T _{3,6}
P _{1,4} 0.0003	P _{2,4} 0.14021	P _{3,4} 0.2779	X	T _{4,5}	T _{4,6}
P _{1,5} 0.15204	P _{2,5} 0.32628	P _{3,5} 0.43169	P _{4,5} 0.82259	X	T _{5,6}
P _{1,6} 0.35824	P _{2,6} 0.30257	P _{3,6} 0.15926	P _{4,6} 0.36355	P _{5,6} 0.47556	X

P1: Temefos vivos, P2: Temefos muertos, P3: Cis-permetrina vivos, P4: Cis-permetrina muertos, P5: New Orleans, P6: Campo.

Índice de diversidad beta

Índice de Bray Curtis

Los resultados del índice de diversidad beta (Bray Curtis) se muestran en la figura 27, los resultados indican que existe similitud entre los tratamientos temefós vivos con temefós muertos y caso contrario presentado las larvas expuestas al insecticida cis-permetrina, en donde se observa disimilitud entre los tratamientos vivos con muertos

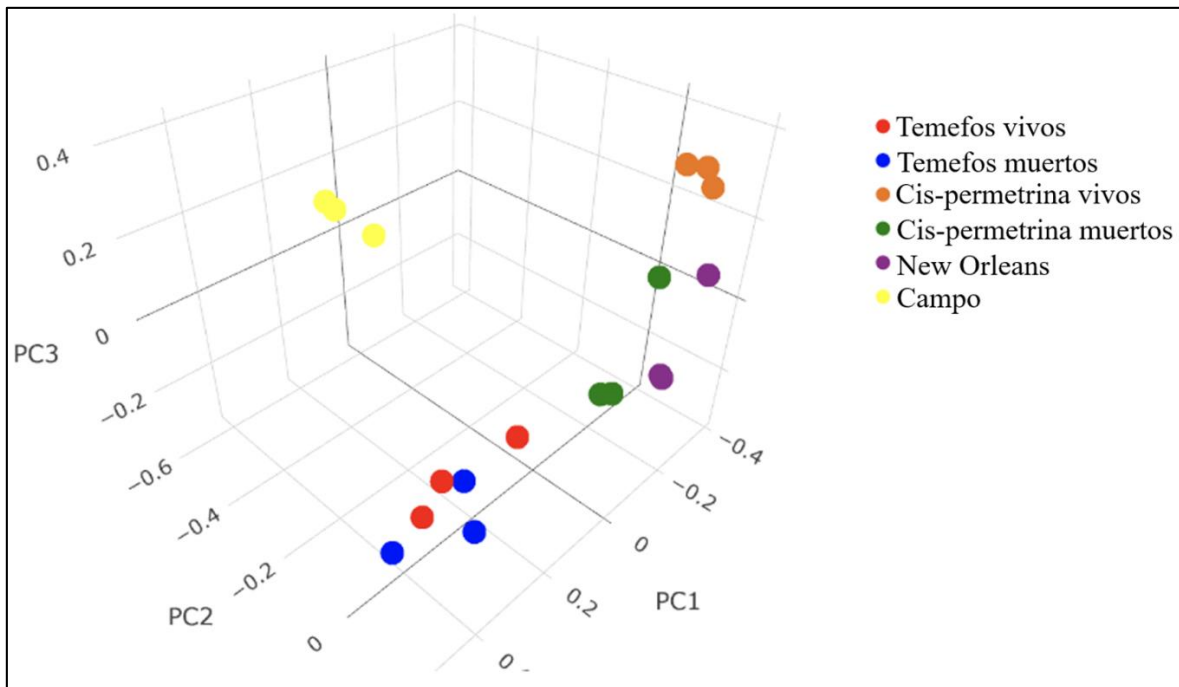


Figura 27. Diversidad beta (Índice de Bray Curtis) de los 6 tratamientos en larvas de *Ae. aegypti*.

DISCUSIÓN

Susceptibilidad

En México, como en otros países se ha llevado el control de vectores transmisores de enfermedades por medio del uso de insecticidas, *Ae. aegypti* es capaz de desarrollar resistencia a la totalidad de los insecticidas usados para el control de éstos, de manera que las dosis iniciales del tóxico efectivas (insecticida) no logran controlar a las poblaciones resistentes (de la Cruz et al. 2014), provocando como respuesta contigua aumentar la frecuencia del tratamiento o la concentración del insecticida agravando el fracaso del control químico (Kuri et al. 2017).

En el presente estudio se determinó la dosis respuesta y razón de resistencia en la población de campo (Guadalupe) y una cepa susceptible (NO) de *Ae. aegypti* para los insecticidas temefos y permetrina en larvas. Primeramente, en nuestro laboratorio, la CL_{50} en temefos para la cepa susceptible (NO) es de 0.003 ppm (0.003-0.004) y una CL_{99} de 0.012 ppm (0.009-0.026), para la población de Guadalupe se obtuvo una CL_{50} de 0.022 ppm (0.019-0.026) y una CL_{99} de 0.114 ppm (0.080-0.207), obteniendo un valor de RR_{50} de 7.33 y un valor de RR_{99} de 9.5. Chávez et al. (2005) reporta en la población susceptible (Rockefeller) una CL_{50} de 0.0122 (0.01178-0.01320) y para las poblaciones de campo (Florencia de Mora) la CL_{50} de 0.03721 ppm (0.03324-0.03920), con una RR_{50} de 3.05, la de Laredo con una CL_{50} de 0.03035 ppm (0.03035-0.03736) con una RR_{50} de 2.82, el Milagro con una CL_{50} de 0.02671 ppm (0.02299-0.02878) con una RR_{50} de 2.19, en comparación con nuestros resultados podemos mencionar que en cepa susceptible y de campo presentaron mayor susceptibilidad al insecticida temefos, a excepción de la población de el Milagro ya que presenta valores similares, que a los de Guadalupe.

Putra et al. (2016) reportan que para temefos en la cepa susceptible (VCRU) una CL_{50} de 0.024 ppm (0.022-0.027), una CL_{95} de 0.57 ppm (0.048-0.75), en la población de campo (Bogor) obtuvieron una CL_{50} de 0.48 ppm (0.39-0.76) y una CL_{95} de 1.32 ppm (0.81-7.54) ppm, obtuvieron valores de RR_{50} de 1.32 y una RR_{95} de 2.32, en comparación con nuestros resultados podemos mencionar que tanto como la cepa susceptible, como la de Guadalupe presentaron mayor susceptibilidad. Goindin et al. (2017) obtuvo en la población susceptible (Bora Bora) una CL_{50} de 0.008 ppm (0.008-0.009) y una CL_{95} de 0.014 ppm (0.012-0.017), para la población de campo (Saint Martin) se obtuvo una CL_{50} de 0.071 ppm (0.062-0.081) y una CL_{95} de 0.160 ppm (0.143-0.183), con valores de RR_{50} de 8.875 y una RR_{95} de 11.429, estos resultados nos indican que la cepa susceptible y la Guadalupe son más susceptibles que las del presente autor.

Khan et al. 2019, en la cepa susceptible obtuvo una CL_{50} de 0.01 ppm (0.005-0.02), en la población de Faisalabad obtuvo una CL_{50} de 0.26 ppm (0.22-0.32), con una RR_{50} de 43.66, en la población de Gujranwala se presentó una CL_{50} de 0.06 ppm (0.05-0.08), con una RR_{50} de 10.17, en la población Lahore una CL_{50} de 0.08 ppm (0.07-0.09), con una RR_{50} de 13.33 y por último la población de Multan se obtuvo una CL_{50} de 0.03 ppm (0.02-0.04), con una RR_{50} de 4.50, los valores determinados de cada población nos indican que se presenta una

mayor susceptibilidad en nuestra cepa susceptible y la población de Guadalupe, ya que ambas fueron menor a las concentración mencionadas, de las poblaciones analizadas por el presente autor.

Por último, Fernando et al. (2020) en la población susceptible (NO) obtuvo una CL_{50} de 0.0043 ppm (0.0040-0.0045), una CL_{90} de 0.0064 ppm (0.0059-0.0070), en la población Colombo se presentó una CL_{50} de 0.0167 ppm (0.0145-0.0192), una CL_{90} de 0.0414ppm (0.0318-0.0538), con una RR_{50} de 3.88 y una RR_{90} de 6.47, para la población Galle se obtuvo una CL_{50} de 0.0169 ppm (0.0155-0.0184) y una CL_{90} de 0.036 ppm (0.031-0.042), una RR_{50} de 3.93 y una RR_{90} de 5.63 y para Hambanthota una CL_{50} de 0.0112 ppm (0.0143-0.0199) y una CL_{90} de 0.0210 ppm (0.0179-0.0245), una RR_{50} de 3.93 y una RR_{90} de 6.78. Estos resultados mencionan que hay una similitud en cepa susceptible y en la población de Colombo, mientras que en las poblaciones de Galle y Hambanthota, presentaron mayor susceptibilidad que la población de Guadalupe.

Para el insecticida Cis-permetrina en la población susceptible (NO) se obtuvo una CL_{50} de 0.001 ppm (0.001-0.002) y una CL_{99} de 0.067 ppm (0.031-0.220), en la población de campo (Guadalupe) se obtuvo una CL_{50} de 0.071 ppm (0.056-0.91) y una CL_{99} de 3.882 ppm (1.841-12.343), así mismo se obtuvo una RR_{50} de 71 y un valor de RR_{99} de 57.94.

Putra et al. (2016) reportó para la población susceptible (VCR) una CL_{50} de 0.010 ppm (0.03-0.017) y una CL_{95} de 0.067 ppm (0.044-0.13), en la población de Bogor obtuvieron una CL_{50} de 0.021 ppm (0.016-0.027) y una CL_{99} de 0.108 ppm (0.07-0.22), así mismo se obtuvieron una RR_{50} de 2.10 y una RR_{95} de 1.61. En base a los resultados, podemos mencionar que en la cepa susceptible se presenta una mayor susceptibilidad por parte de la CL_{50} , pero una similitud en el valor obtenido de CL_{99} , junto con ello la población de Bogor presentó una mayor susceptibilidad que la población de Guadalupe, ya que presentó valores más bajos que los del presente estudio.

Leong et al. 2018, en la cepa Bora Bora (Susceptible) presentó una CL_{50} de 0.00090 ppm (0.00079-0.00103), con una CL_{99} de 0.01631 ppm (0.01030-0.03148), para la población Gombak obtuvieron una CL_{50} de 0.00168 ppm (0.00084-0.00369), junto con ello una CL_{99} de 0.31004 ppm (0.05482-22.01905), RR_{50} de 1.87 y una RR_{99} de 19.0, en la población Hulu Langat obtuvieron una CL_{50} de 0.00107 ppm (0.00044-0.00209), con una CL_{99} de 0.00750 ppm (0.00303-11.80268), con una RR_{50} de 1.9 y una RR_{99} de 0.45, en la población Klang obtuvieron una CL_{50} de 0.00074 ppm (0.00518-0.01122), con una CL_{99} de 0.04622 ppm (0.01544-0.37133), en los cuales obtuvieron valores de RR_{50} de 3.89 y una RR_{99} de 28.33, por parte de Petaling obtuvieron una CL_{50} de 0.00582 ppm (0.00340-0.00917), junto con ello una CL_{99} de 0.12193 ppm (0.4221-3.16567), con una RR_{50} de 6.47 y una RR_{99} de 7.47. En base a los resultados presentados por el presente autor, podemos mencionar que la cepa susceptible y las poblaciones son más susceptibles, que las del presente estudio.

Marcombe et al. (2019), en la población USDA (Susceptible) obtuvo una CL_{50} de 1.1 ppm (1.1-1.2) y con una CL_{95} de 1.6 ppm (1.6-1.7), en la población de Xayaboury se obtuvo una CL_{50} de 10.3 ppm (9.6-11) y una CL_{95} de 26.3 ppm (23.2-31.1), con una RR_{50} de 9.4 y una

RR₉₅ de 16.4, para la población, en la población Luang Prabang presento una CL₅₀ de 9.2 ppm (8.7-9.8), con una CL₉₅ de 22.7 ppm (20-26.4), así mismo obtuvieron una RR₅₀ de 8.4 y una RR₉₅ de 14.2, en la población de Saravane obtuvieron una CL₅₀ de 10.6 ppm (10-11.2), una CL₉₅ de 22.2 ppm (19.9-25.7), con una RR₅₀ de 9.6 y una RR₉₅ de 13.9. Estos resultados nos indican que tanto la cepa New Orleans y Guadalupe son más susceptibles que las del presente autor.

Khan et al. (2019), en la cepa susceptible obtuvo una CL₅₀ de 0.60 ppm (0.47-0.77), en la población de Faisalabad obtuvo una CL₅₀ 10.90 ppm (8.82-13.92), con una RR₅₀ de 18.80, en Gujranwala una CL₅₀ de 7.52 ppm (6.33-9.1), con una RR₅₀ de 12.47, en Lahore una CL₅₀ de 13.00 ppm (10.14-18.14), con una RR₅₀ de 21.55 y en Multan con una CL₅₀ de 7.80 ppm (6.68-9.18), con una RR₅₀ de 12.93, estos resultados nos indican que las cepa New Orleans y la población de Guadalupe, son más susceptibles que la cepa susceptible y las poblaciones de campo del autor Khan.

Fernando et al. (2020), en la población de New Orleans (Susceptible) obtuvieron una CL₅₀ de 0.6783 ppm (0.6078-0.7569), una CL₉₀ de 1.65 ppm (1.26-2.16), en la población de Colombo obtuvieron una CL₅₀ de 8.75 ppm (7.84-9.98), con una CL₉₀ de 15.88 ppm, junto con ello una RR₅₀ de 12.9 y una RR₉₀ de 9.62, en la población de Galle una CL₅₀ de 5.04 ppm (4.23-5.99), una CL₉₀ de 17.30 (13.10-22.86), con una RR₅₀ de 7.4 y una CL₉₀ de 10.48, en la población Trincomalee obtuvieron una CL₅₀ de 4.42 ppm (3.87-5.05), una CL₉₀ de 11.42 ppm (8.88- 14.69), con una RR₅₀ de 6.5 y una RR₉₀ de 6.92. Con este resultado podemos inferir que nuestra cepa New Orleans y población de Guadalupe son más susceptibles que las del presente autor.

Microbiota

Los insectos representan el grupo más diverso en el planeta y uno de los factores que se le atribuye el éxito evolutivo y ecológico son los microorganismos que presentan, los insectos están íntimamente asociados con las bacterias en todas las etapas de su vida, la microbiota intestinal juega un rol importante en la dieta, inmunidad y desintoxicación (Moran 2007; Shi et al. 2013). Investigaciones previas mencionan que la microbiota puede jugar un papel preponderante en la resistencia a insecticidas, donde esto se ha descrito primeramente en insectos de importancia agrícola como *Riptortus pedestris*, en el cual se determinó que la bacteria del género *Burkholderia* ha sido asociada en la degradación de insecticidas organofosforados como el fenitriton (Kikuchi et al. 2012; Tekeshita et al. 2017; Arévalo et al. 2020).

En lo insectos de importancia médica, especialmente los mosquitos adquieren la mayoría de microorganismos en su estadio larvario, en cada uno de los estadios sucesivos hay un cambio en la composición bacteriana, estas pueden colonizar diferentes tejidos en el mosquito (Strand et al. 2017), investigaciones mencionan que existen bacterias en el mosquito pueden contribuir en la competencia vectorial (Gendrin et al. 2013; Wilke y Marrelli, 2015; Wang et al. 2017) y en la resistencia a insecticidas, un ejemplo es en *Anopheles albimanus*, en el cual se determinó bacterias del género *Acinetobacter sp.* que pueden degradar insecticidas

organofosforados como malatión, clorpirifos y metil paratión (Smith y Adkins, 1996; Brogdon et al. 2014; Azmy et al. 2015; Dada et al. 2018; Arévalo et al. 2020). Por ello en el presente estudio realizamos la determinación de la microbiota intestinal en larvas de *Ae. aegypti* expuestos a 2 insecticidas de grupos diferentes (Piretroides y Organofosforados), con el objetivo de determinar si la microbiota intestinal genera mayor o menor susceptibilidad a los insecticidas.

En el presente estudio se procesaron 18 muestras, las cuales se dividieron en 6 grupos (Temefos vivos (TV), Temefos muertos (TM), cis-permetrina vivos (CPV), cis-permetrina muertos (CPM), campo (CA) y New Orleans (NO)), en los 6 grupos obtuvimos que en el nivel taxonómico phylum, el que presenta mayor abundancia es Proteobacteria con más del 66% en las muestras procesadas, seguido de Bacteroidetes con un 19% y en tercer lugar a Actinobacteria con 11%, el resto de los phylums como Cyanobacteria, Firmicutes, Armatimonadetes, Chlorobi, Armatimonadetes, Febriobacteres entre otros, representan menos del 5%.

Por parte de Yadav et al. (2016), realizaron un estudio sobre la microbiota intestinal en larvas *Ae. albopictus*, determinaron 3 phylums dominantes, el que presento mayor abundancia es Firmicutes con 43.75%, posteriormente Proteobacteria con 31.25% y por último Actinobacteria con 25%, estas se extrajeron directamente de campo para su análisis, en comparación con nuestros resultados, podemos mencionar que hay diferencia en el número de phylums determinados en la muestra de campo ya que se encontraron 15 en total, también se presenta diferencia en los 3 phylums con mayor abundancia, siendo Proteobacteria el más abundante con 66%, seguido de Bacteroidetes con un 19% y en tercer lugar a Actinobacteria con 11%, esto de igual manera se presentó en los otros 5 tratamientos analizados.

Ramos et al. (2020), realizo la determinación de la microbiota intestinal de 2 poblaciones, una población de *Ae. aegypti* y una de *Culex quinquefasciatus*, ellos presentaron 4 phylums para ambas poblaciones, el phylum con mayor abundancia fue Proteobacteria con 81.28% en *Ae. aegypti* y 94.92% en *Cu. quinquefasciatus*, seguido de Actinobacteria con 16.7% y 2.81, Spirochates con 1.54% y 1.94% y por ultimo el phylum Firmicutes con 0.28% y 0.26%, comparado con nuestros resultados podemos mencionar que hay diferencia en el número de phylums siendo 15 en total, por otro lado, hay similitud en que Proteobacteria es el phylum con mayor abundancia, pero si hay diferencia en la abundancia de Actinobacteria y Firmicutes, esto puede deberse al lugar donde se desarrollaron los mosquitos, ya que *Ae. aegypti* se reproduce en aguas más limpias que *Cu. quinquefasciatus*, ya que este se encuentra en sitios de agua estancada y de poca oxigenación.

Arévalo et al. (2020), determino la microbiota intestinal en *Ae. aegypti*, en donde utilizo 2 cepas, una resistente al insecticida lambda-cyhalotrina y una susceptible, en ambos tratamientos determinaron que el phylum más abundante es Proteobacteria con más del 60%, Firmicutes con más del 20%, Actinobacteria aproximadamente con 10%, el resto de los phylums como Bacteroidetes, Cyanobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia,

Gemmatimonadetes y Deferribacteres representan menos del 10%. Con estos resultados podemos mencionar que, en comparación con los nuestros, el phylum con mayor presencia es Proteobacteria, junto con ello se presenta similitud en la abundancia del phylum Actinobacteria, junto con ellos que se presenta un cambio en la abundancia tanto para el phylum Firmicutes como en Bacteroidetes.

Los resultados obtenidos a nivel taxonómico familia de los 6 grupos procesados, menciona que para temefos vivos se determinaron 23 familias, dentro de las cuales, las más abundantes fueron, Comamonadaceae con 48.33%, Microbacteriaceae con 19.23%, Cytophagaceae con 9.67%, por otra parte, temefos muertos se determinaron 19 familias, Microbacteriaceae con 37.17%, Comamonadaceae 36.63%, Moraxellaceae con 6.83%, Methylobacteriaceae con 5.53%.

Para cis-permetrina vivos se determinaron 32 familias, dentro de las cuales las más abundantes fueron Comamonadaceae con 30.33%, Caulobacteriaceae con 15.70%, Cytophagaceae con 15.00%, Flavobacteriaceae con 11.27% y Enterobacteriaceae con 5.17%, para cis-permetrina muertos 22 familias, las bacterias con mayor abundancia fueron Enterobacteriaceae con 36.00%, Flavobacteriaceae con 12.33%, Comamonadaceae con 12.23%, Pseudomonadaceae con 10.57%, Moraxellaceae con 9.90% y Cytophagaceae con 8.80%.

En el tratamiento de New Orleans se determinaron 18 familias, siendo este tratamiento con menor número de familias de los 6 grupos, las familias con mayor abundancia son Flavobacteria con 41.30%, Enterobacteriaceae con 18.57%, Moraxellaceae con 15.77% y por último Comamonadaceae con 14.73%, por otra parte, el tratamiento de campo se determinaron 90 familias, dentro de las cuales las que presentaron mayor abundancia fueron Rhodocyclaceae con 33.33%, Comamonadaceae con 13.23% y Porphyromonadaceae con 9.90%.

Comparando los resultados obtenidos con los autores previamente descritos, Yadav et al. (2016), determino 11 familias, dentro de las cuales, los más abundantes fueron Bacillaceae con 25%, seguido de Enterobacteriaceae con 11%, Microbacteriaceae con 10%, comparado con nuestros resultados, se presenta diferencia en el número de familias determinadas en el presente estudio, determinando 90 familias diferentes entre las 6 tratamientos, junto con ello se encuentra similitud con respecto a la presencia de las bacterias determinadas por el autor, ya que también fueron encontradas pero no con la misma abundancia.

Ramos et al. (2020), determino 14 familias para las poblaciones *Ae. aegypti* y *Cu. quinquefasciatus*, las que presentaron mayor abundancia fueron Enterobacteriaceae con 72.8% y 11.16%, luego la familia Actinomycetaceae con 16.7% y 2.81%, Spirochaetaeaceae con 0.94% y 1.18%, por último, Leuconostocaceae con 0.1% y 0.02%, se presenta similitud en que la familia Enterobacteriaceae siendo el que presenta mayor abundancia, mientras que en las otras bacterias si hay un cambio en la abundancia.

Por parte de Arévalo et al. (2020), presento 36 familias en las cepas resistente y susceptible, dentro de las cuales las familias con mayor abundancia fueron Mitochondria con aproximadamente 40%, Bacteroidetes con un 35% Erysipelotrichaceae con 15%, el resto de las bacterias representan menos del 10% de la abundancia total.

Los resultados obtenidos a nivel taxonómico especie de los 6 grupos procesados, mencionan que para la el tratamiento de temefos, en la muestra temefos vivos se determinaron 60 especies, dentro de las cuales *Pseudacidovorax intemedius* fue la más abundante con 24.97%, *Delftia lacustris tsuruhantesis* con 18.00%, *Microbacterium hominis laevoniformans* con 16.60% y *Flectobacillus major* 9.76%, por otra para temefos muertos se determinaron 52 especies, las más abundantes fueron *Microbacterium hominis laevaniformans* con 32.53%, *Pseudacidovorax intermedius* con 27.60%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 7.53, *Acinetobacter soli* con 6.57%, *Methylobacterium sp* con 5.43%.

En cis-permetrina vivos se determinaron 88 especies, las más abundantes fueron *Asticcacaulis excentricus* con 15.47%, *Flectobacillus major* con 14.83%, *Acidovorax cattleyae citrulli* con 14.63%, *Elizabethkingia meningoseptica* con 6.97%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 5.30%, para cis-permetrina muertos se determinaron 53 especies, las más abundantes fueron *Serratia marcescens nematodiphila* con 29.50%, *Chryseobacterium ginsengisoli indologenes* con 10.90%, *Pseudomonas otitidis* con 10.50%, *Delftia lacustris tsuruhatensis* con 10.13%, *Flectobacillus major* con 8.80%, *Acinetobacter calcoaceticus pittii* con 8.10%.

Por parte del autor ya antes descrito Yadav et al. (2016), determino 11 géneros diferentes en la población de *Ae. albopictus*, los más abundantes fueron *Bacillus* con 25%, seguido de *Staphylococcus* con 12.5% y *Pseudomonas* con 12.5% y la especie con mayor abundancia fue *Acinetobacter pittii* con 14.7%, está en comparación con nuestros resultados, se presenta en los 6 grupos, pero con menor abundancia.

Ramos et al. (2020), determino que para las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Cu. quinquefasciatus*, se presentaron 14 géneros, entre ellos los más abundantes fueron *Escherichia sp.* con 64.52% para *Ae. aegypti* y 11.15% para *Cu. quinquefasciatus*, *Serratia sp.* con 8.28% y 0.01%, *Actinomyces* con 16.7% y 2.81% y por último *Leuconostoc* con 0.1% y 0.02%, comparando nuestros resultados, hay diferencia en el número de géneros determinados, los genero de las bacterias determinadas por el presente autor se encuentran en los tratamientos analizados, pero ni en la misma abundancia.

Por último, Dada et al. (2018), realizaron el análisis de microbiota en 2 cepas de *Anopheles albimanus*, una cepa resistente en la cual determinaron 36 géneros, los que presentaron mayor abundancia fueron *Klebsiella sp.* con 77.57%, *Acinetobacter sp.* con 7.74% y *Enterobacter sp.* con 5.56%, por parte de la cepa susceptible determinaron de igual manera 36 géneros, los más abundantes fueron *Klebsiella sp.* con 52.42%, *Enterobacter sp.* con 27.09% y *Acinetobacter sp.* con 11.91%, en comparación con los resultados con los del presente autor podemos mencionar primeramente que hay más especies determinadas en el presente trabajo, que con los del presente autor, como segundo punto mencionamos que Dada et al.

presentaron las mismas bacterias en ambas cepas, pero si hubo un cambio en su abundancia, esto de igual manera se obtuvo en el presente trabajo para cada uno de los insecticidas utilizados, cabe mencionar que si hay un cambio en las especies determinadas para cada insecticida.

Índices de diversidad

Los valores establecidos en el índice de Shannon mencionan que se presentó mayor riqueza de especies en el tratamiento de campo con un valor de 4.26, seguido del tratamiento de cis-permetrina vivos con 4.18, temefós vivos con 3.1, New Orleans con 2.99, cis-permetrina muertos con 2.96 y por último temefós muertos que presento el valor más bajo con 2.72.

Álvaro et al. (2020), utilizo el índice de Shannon, para analizar la riqueza de especies en la microbiota intestinal en mosquito, analizo 1 población de resistente, donde obtuvo un valor de 3.80 y una cepa susceptible con un valor de 4, comparando nuestros resultados podemos mencionar que se presentó diferencia entre los tratamientos de campo y cis-permetrina vivos, presentando un valor mayor que los establecidos por el presente autor, por otra parte en los demás tratamientos analizados, se obtuvieron valores menores que los establecidos por el autor, lo que hace mención a que hay un bajo nivel de riqueza en comparación a los del autor.

Por parte de Yadav et al. (2015), utilizo el índice de Shannon para analizar la riqueza de especies en la microbiota intestinal de 2 población de mosquitos, en la población de *Ae. aegypti* obtuvo un valor de 2.185 y en la población de *Ae. albopictus* con 2.306, comparando nuestros resultados, mencionamos que se presenta mayor riqueza de especies en los 6 tratamientos analizados, esto puede deberse a la dominancia de ciertas bacterias en la microbiota intestinal en los mosquitos lo que conlleva menor riqueza de especies.

Así mismo Yadav et al. (2016), utilizo el índice de Shannon para analizar la microbiota intestinal de 4 cepas de *Ae. albopictus*, las cuales son hembras alimentadas con sacarosa, hembras alimentadas con sangre, machos y larvas, las hembras alimentadas con azúcar presentaron 2.37, las hembras alimentadas con sangre 2.17, los machos 2.36 y por ultimo las larvas que presentaron un valor de 2.66, comparando nuestros resultados podemos mencionar, que en nuestros 6 tratamientos se presenta mayor riqueza de especies siendo el tratamiento de campo el valor mayor con 4.26 y el tratamiento temefos muertos fue el más bajo con 2.72, investigaciones mencionan que el estadio larval es donde se presenta mayor riqueza de especies y conforme continua el ciclo, se modifica la microbiota y se presenta disminución en el número de especies, por ello los resultados del presentar autor la cepa larval es la tiene mayor riqueza.

En el índice de Simpson, se presenta para temefós muertos mayor dominancia y menor diversidad con 0.72, seguido de los tratamientos de campo y cis-permetrina muertos con 0.75, para temefós vivos se obtuvo un valor de 0.76, New Orleans con 0.77 y por último el tratamiento cis-permetrina vivos presento un valor de 0.89, este representa la mayor dominancia y menor diversidad. Por parte de Yadav et al. (2015), presentaron un valor en la

población de *Ae. aegypti* de 0.82 y en *Ae. albopictus* de 0.85, comparando estos resultados con nuestros tratamientos, podemos mencionar que presentan menor dominancia y mayor diversidad, con excepción del tratamiento cis-permetrina vivos el cual presento el valor mayor en comparación con los del autor.

Yadav et al. (2016), en el índice de Simpson, para la cepa hembra alimentada con azúcar obtuvo un valor de 0.89, para la hembra alimentada con sangre obtuvo un valor 0.87, para la cepa de machos obtuvo un valor de 0.89 y para la cepa larval un valor de 0.92, comparado con nuestros resultados se presentó un valor máximo de 0.89 por parte del tratamiento cis-permetrina vivos y el tratamiento temefos muertos obtuvo el menor valor con 0.72, podemos mencionar que al aplicar un insecticida se modifica la microbiota intestinal tanto para adulto como para larva, lo que con lleva en un aumento en la dominancia de ciertas especies y otras que ya no se presentan.

Por parte del índice de Chao1, se basa en un estimador del número de especies en la comunidad basado en el número de especies raras en las muestras, en el presente estudio el valor mayor lo obtuvo el tratamiento de campo con 246.67, cis-permetrina vivos con 84.63, temefos vivos con 55, temefos muertos con 45.66, cis-permetrina muertos 43 y por último New Orleans con 37.3, Arévalo et al. (2020), análisis cepa resistente en el cual obtuvo un valor de 210 y en la cepa susceptible un valor 230, comparado con nuestros resultados podemos mencionar que se encuentra un valor mayor en el tratamiento de campo, ya que al no ser expuesto por insecticidas, no fue modificada la microbiota, lo que conlleva un mayor número de especies determinadas, por parte de los otros 5 tratamientos se encontraron por debajo de los valores establecidos por el presente autor.

El índice de diversidad beta (Bray Curtis), nos presenta que en los tratamientos temefós vivos y muertos existe disimilitud, por otra parte, los tratamientos cis-permetrina vivos y muertos, se presentó disimilitud, Ramos et al. (2020), utilizaron índice de Bray Curtis, para el análisis de una cepa susceptible y una población resistente de mosquitos, donde mencionan que se presenta una similitud entre ambas muestras.

CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad se determinó que la población de Guadalupe es tolerante al larvicida temefos con una RR_{50} de 7.33, mientras que para el insecticida cis-permetrina es resistente ya que se determinó una RR_{50} de 71.
- No se determinó un cambio en la composición bacteriana entre los tratamientos vivos y muertos para ambos insecticidas, pero si indican un cambio en la abundancia, el uso de 2 insecticidas diferentes (piretroide y organofosforado) hizo que se presentaran diferentes bacterias (*Pseudacidovorax intermedius*, *Microbacterium hominis laevoniformans*, *Delfia lacustris tsuruhatensis*, *Asticcacaulis excentricus*, *Flectobacillus major*, *Acidovorax cattleyae citrulli*, *Serratia marcescens nematodiphila*, *Chryseobacterium ginsengisoli indologenes* y *Pseudomonas ottidis*) entre los tratamientos.
- Los resultados de los índices de diversidad alfa Shannon, Chao1 y Fisher, indican que el tratamiento con mayor diversidad fue campo, junto con ello el tratamiento temefos y cis-permetrina vivos presentaron mayor diversidad que los tratamientos temefos y cis-permetrina muertos, en el índice de Simpson, el tratamiento de cis-permetrina vivos fue el más diverso y el tratamiento de temefos muertos fue el que presento menos diversidad.
- En relación al índice de diversidad beta (Bray Curtis) indica que existe similitud entre los tratamientos de cis-permetrina vivos y muertos, mientras que hay una disimilitud entre los tratamientos temefós vivos con temefós muertos.

LITERATURA

A. Soltani, H. Vatandoost, M. A. Oshaghi, A. A. Enayati, A. R. Chavshin, The role of midgut symbiotic bacteria in resistance of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) to organophosphate insecticides. *Pathog Glob Health* 111, 289-296 (2017).

Aedes aegypti is associated with kdr-type resistance. *Trop. Biomed.* 32: 140–150. *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* 2016, 30: 375.

Ahmad Mohiddin, Asmalia Md Lasim, Wan Fatma Zuharah, Susceptibility of *Aedes albopictus* from dengue outbreak areas to temephos and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(4): 295–300

Apóstol, B. L.; Black, W. C.; Reiter, P.; Miller, B.R. 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polimerasa chain reaction to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 51: 89-97.

Arevalo-Cortés A, Mejia-Jaramillo AM, Granada Y, Coatsworth H, Lowenberger C, Triana-Chavez O. La microbiota del intestino medio de poblaciones colombianas de *Aedes aegypti* con diferentes niveles de resistencia al insecticida lambda-cihalotrina. *Insectos* 2020; 11 (9): 584.

Asociación Costarricense de Salud Pública. A, scielo (Online service) J. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. 22(1):68–75.

Azmy, A. F., Saafan, A. E., Essam, T. M., Amin, M. A. y Ahmed, S. H. Biodegradación de malatión por *Acinetobacter baumannii* cepa AFA aislada de aguas residuales domésticas en Egipto. *Revista Internacional de Ingeniería Biológica, Biomolecular, Agrícola, Alimentaria y Biotecnológica* 9, 54–65 (2015).

Bandi C, Favia G: Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of Bates, A.W. 1949. *The Natural History of Mosquitoes.*

Bennett KE, Olson KE, De M, Muñoz L, Muñoz M, Fernández-Salas I, et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States.

Bhatt S, Gething P, Brady O, Messina J, Farlow A, Moyes C, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496 (7446): 504-7.

Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Pan Am J Public Health.*

Bowman LR, Donegan S, mccall PJ. Is dengue vector control deficient ineffectiveness or evidence: Systematic review and meta-analysis.

Braack, L., Gouveia de Almeida, A.P., Cornel, A.J., Swanepoel, R., de Jager, C., 2018. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasite Vector* 11, 29.

Broderick, N. A., Raffa, K. F., and Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15196–15199. doi: 10.1073/pnas.0604865103

Brogdon, W. G., Chan, A. Directriz para evaluar la resistencia a insecticidas en vectores mediante el bioensayo en botella de los CDC. CDC Atlanta

Brower, J. E. y J. H. Zar. 1984. Field and laboratory methods for general ecology. Wm. C. Brown Co. Dubuque, Iowa. 226 pp.

Brune A: Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trend Biotechnol* 1998, 16:16-21.
3. Dillon RJ, Dillon VM: The gut bacteria

Buck M, Nilsson LKJ, Brunius C, Dabire RK, Hopkins R, Terenius O: Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes, 2016.

Burgess, N. R. H.; Cowan, G. O. 1993. A colour Atlas of Medical Entomology. Chapman y Hall. G. B. Cevallos V, Ponce P, Waggoner JJ, Pinsky BA, Coloma J, Quiroga C, et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador.

Callahan, Benjamin J; McMurdie, Paul J; Rosen, Michael J; Han, Andrew W; Johnson, Amy Jo A; Holmes, Susan P (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*.

Caporaso, J.G. et al. *Nat. Methods* 7, 335–336 (2010).

Carlson JS, Short SM, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. La exposición de las larvas a bacterias modula la infección por arbovirus y la expresión de genes inmunes en *Aedes aegypti* adultos. *Dev Comp Immunol.* 2020 Mar; 104: 103540.

Chadee D. D. Y P. S. Corbet. 1987. Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the field of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. *Ann. Trop. Medicine and Parasitol.* 81(2): 151-161.

Chansang, A., Champakaew, D., Junkum, A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, A.K., Riyong, D., Wannasan, A., Intirach, J., Muangmoon, R., & Pitasawat, B. (2018). Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*.

Chao J, Wistreich GA: Microbial isolations from the mid-gut of *Culex tarsalis* Coquillett. *J Insect Pathol* 1959, 1: 311-318.

Chavasse DC, Yap HH, World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization.

Che Mendoza Azael, González Acosta Cassandra, Mazari Benítez Oscar, guía para la cría y mantenimiento de colonias de mosquitos *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) en condiciones de insectario, 2007, Centro Regional de Control de Vectores Panchimalco, Jojutla, Morelos.

Cheng, D., Guo, Z., Riegler, M., Xi, Z., Liang, G., and Xu, Y. (2017). Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel).

Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, Ulissi U, Crotti E, Daffonchio D, Christophers, K. M. 1960. *Aedes aegypti* L. The yellow fever mosquito. Cambridge University Press. GB. 784 pps

Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae).

Correa, M. A., Matusovsky, B., Brackney, D. E., & Steven, B. (2018). Generation of axenic *Aedes aegypti* demonstrate live bacteria are not required for mosquito development. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-07014-2

Costero, A.; Attardo, G. M.; Scott, T. W.; Edman, J. D. 1998a. An experimental study on the detection of fructosa in *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*.14: 234-242.

Dada N, Sheth M, Liebman K, Pinto J, Lenhart A. La secuenciación completa del metagenoma revela vínculos entre la microbiota de mosquitos y la resistencia a insecticidas en los vectores de la malaria. *Sci Rep*. 2018 1 de febrero; 8 (1): 2084.

de la Cruz-Gallardo, Carlos M .; Rodríguez-Pérez, Candelario; Ocaña-Zurita, Francisco J. Susceptibility and resistance to insecticide in mosquitoes that transmit dengue *Salud in Tabasco*, vol. 20, no. 2, May-August, 2014, pp. 54-59 Secretary of Health of the State of Tabasco Villahermosa, Mexico.

Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, 3, 6-13.

Diaz-Nieto LM, Alessio CD, Perotti MA, Beron CM: *Culex pipiens* development is greatly influenced by native bacteria and exogenous yeast. *PLoS One* 2016, 11: e0153133.

Dickson LB, Jiolle D, Minard G, Moltini-Conclois I, Volant S, Ghoulane A, Bouchier C, Ayala D, Paupy: Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector.

Ding F, Fu J, Jiang D, Hao M, Lin G. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Trop*. 2018; 178: 155–162.

DJ Gubler. Dengue, urbanización y globalización: la impía trinidad del siglo XXI. *Trop Med Health*. 2011; 39 (4): 3-11.

Edman, J.D.; Strickman, P.; Kittayapong, P.; Scott, T. W. 1992. Female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. *Journal of Medical Entomology*. 29:1035-1038.

Engel, P., y Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735.

Estep AS, Sanscrainte ND, Waits CM, Bernard SJ, Lloyd AM, Lucas KJ, et al. (2018) Quantification of permethrin resistance and kdr alleles in Florida strains of *Aedes aegypti* (L.) And *Aedes albopictus* (Skuse).

Fernando, H. Sachini D.; Saavedra-Rodriguez, Karla; Perera, Rushika; Black, William C.; De Silva, B. G. D. Nissanka Kolitha (2020). Resistance to commonly used insecticides and underlying mechanisms of resistance in *Aedes aegypti* (L.) from Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, 13(1), 407.

Flores E. Adriana., 2014. Detección de resistencia a insecticidas en mosquitos con énfasis en *Aedes aegypti*. *Artrópodos y Salud Septiembre-diciembre*, 2014. Vol. I No. 2.

Frankenhuyzen, K., Liu, Y., and Tonon, A. (2010). Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. *J. invertebr. Pathol.* 103, 124–131.

G. Minard, P. Mavingui, C. V. Moro, Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito 596 holobiont. *Parasit Vectors* 6, (2013).

G. S. Kwon, H. Y. Sohn, K. S. Shin, E. Kim, B. I. Seo, Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 845-850 (2005).

Gendrin M, Zaidman-Rémy A, Broderick NA, Paredes J, Poidevin M, Roussel A, et al. Análisis funcional de PGRP-LA en la inmunidad de *Drosophila*.

George L, Lenhart A, Toledo J, Lazaro A, Han WW, Velayudhan R, et al. (2015) Community- Effectiveness of Temephos for Dengue Vector Control: A Systematic Literature Review. *Plos Negl Trop Dis* 9(9)

Gómez-Dántes, H.; Ramos-Bonifaz, B.; Tapia-Conyer, R. 1995. The risk of dengue transmission: a space for stratification. *Salud Publica de México*.37: S88-97.

Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, et al. (2013) Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control.

Hernández-Martínez, P., Naseri, B., Navarro-Cerrillo, G., Escriche, B., Ferré, J., and Herrero, S. (2010). Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Microbiol.* 12, 2730–2737

Hien, Do. Si. 1975. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae). II Effect of environmental conditions on the hatching of larvae. *Acta Parasitologica Polonica.* 23(45): 537-552

Hinman EH: A study of the food of mosquito larvae. *Am J Hygiene* 1930, 12: 238-270.

Honório N. A., da Costa Silva W., Leite P. J., Goncalves J. M., Lounibos L. P. Y R. L. De Oliveira. 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(2):191-198.

Horstick O, Runge-Ranzinger S, Nathan MB, Kroeger A. Servicios de control de vectores del dengue: ¿cómo funcionan? Una revisión sistemática de la literatura y estudios de casos de países. *T Roy Soc Trop Med H.* 2010; 104 (6): 379–386.

Housset P, Dickmann R. A promise fulfilled-pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. *Bayer cropsience.* 2009; 62:135–44.

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11585:zika-virus-infection&Itemid=41688&lang=en.

Ibañez-Bernal, S. 1988. Nuevo registro altitudinal del *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) Diptera: Culicidae en México. *Folia Entomológica Mexicana.* 72:163-164. innate immune system and dengue virus influences vector competence.

Interactions with *Plasmodium falciparum* infection. J. M. Lindh, A. K. Borg-Karlson, I. Faye, Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Trop* 107, 242-250 (2008).

J. Pestic Sci. 2008. The anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito. Pp.150.

J. Riveron et al., in *Towards malaria elimination. A leap forward*, S. Manguin, V. Dev, Eds. (Intechopen, 2018).

- K. L. Coon, K. J. Vogel, M. R. Brown, M. R. Strand, Mosquitoes rely on their gut microbiota for 582 development. *Molecular ecology* 23, 2727-2739 (2014).
- Kikuchi, Y., and Yumoto, I. (2013). Efficient colonization of the bean bug *Riptortus pedestris* by an environmentally transmitted burkholderia symbiont. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2088–2091.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., and Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8618–8622.
- Klowden M. J. 1990. The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia* 46: 660-670.
- Komalamisra N, Srisawat R, Apiwathanasorn C, Samung Y, Kaisri P. Residual effect of 10% bifenthrin larvae on dietary microbiota in aquatic surface microlayers. *Med Vet Entomol* 11: 65
- Kuri-Morales, P. A.; Correa-Morales, F.; González-Acosta, C.; Moreno-García, M.; Santos-Luna, R.; Román-Pérez, S.; Salazar-Penagos, F.; Lombera-González, M.; Sánchez-Tejeda, G.; González-Roldán, J. F. (2017). Estado de susceptibilidad a insecticidas en poblaciones mexicanas de *Ae. aegypti*, entomología médica veterinaria.
- Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis.* Elsevier; 2018; 67: 25– 35.
- Lindsay SW, Wilson A, Golding N, Scott TW, Takken W. Mejorar el entorno construido en áreas urbanas para controlar las enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*. *Bull World Health Organ.* 2017; 95 (8): 607–608.
- M. Guégan et al., The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *580 Microbiome* 6, 49 (2018).
- Márquez Benítez Y, Monroy Cortés KJ, Martínez Montenegro EG, Peña García VH, Monroy Díaz AL. Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus del dengue. *Rev CES Med* 2019; 33(1): 42-50.
- Mattingly P. F. 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I Taxonomy and bionomics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 51: 392-408.
- Mazzarri MB, Georghiou GP (1995) Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 11:315–322.
- Mazzarri MB, Georghiou GP (1995) Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 11:315–322

Merritt, R. W.; Dadd, R.H.; Walker, E. D. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationship of larval mosquitoes. *Annual Review of Entomology*. 37:349-376.

Microbiota dominated by few bacterial taxa. *Parasites & Vectors*, 9, 18. Mitraka E, Stathopoulos S, Siden-Kiamos I, Christophides GK, Louis C: *Asaia* accelerates mosquito larvae. *Am J Hygiene* 1935, 21: 167-179.

Morán, N.A. (2007) La simbiosis como proceso adaptativo y fuente de complejidad fenotípica. *P. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104, 8627-8633. doi: 10.1073 / pnas.0611659104.

Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans.

N. Dada, M. Sheth, K. Liebman, J. Pinto, A. Lenhart, Whole metagenome sequencing reveals links 590 between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Scientific Reports* 8, 591 2084 (2018).

Negl Trop Dis 2018, submitted. Nelson, M.J. 1986. *Aedes aegypti*: biología y ecología. Organización Panamericana de la Salud. E.U.A.

Nsa Dada, Juan C Lol, Ana Cristina Benedict, Francisco Lopez, Mili Sheth, Nicole Dzuris Padilla, Pyrethroid exposure alters *Anopheles albimanus* microbiota and resistant mosquitoes harbor more insecticide-metabolizing bacteria, 2019, *Molecular Ecology*, 21, 5138– 5150.

Ohimain EI, Angaye TCN, Basse SE. Comparative larvicidal activities of the leaves, bark, stem and root of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) against malaria vector *Anopheles gambiae*.

Ohkuma M: Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 61:1-9.

Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM (2012) Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota

P. C. Wu et al., Molecular Cloning, Purification, and Biochemical Characterization of a Novel Pyrethroid-Hydrolyzing Esterase from *Klebsiella sp.* Strain ZD112. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 836-842 (2006).

Pájaro N, Flechas MC, Ocazonez R, Stashenko E, Olivero-Verbel J. Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas*.

Pan American Health Organization (PAHO), 2018. Zika Virus Infection.

Pang, S. C., L. P. Chiang, C. H. Tan, I. Vythilingam, S. G. Lam-Phua, and L. C. Ng. 2015. Low efficacy of deltamethrin-treated net against Singapore

Pavliidi N, Monastiriotti M, Daborn P, Livadaras I, Van Leeuwen T, Vontas J. Transgenic expression of the *Aedes aegypti* CYP9J28 confers pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

Perez María. Evaluación del temefos y pyriproxifeno para el control de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. *Horiz. Med.* [online]. 2017, vol.17, n.4, pp.24-29.

Peter Smith. E.U.A. Bellini R, Zeller H, Van Bortel W. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasit Vectors*. 2014; 7:323.

Plant-sugar, glycogen and lipid assay of *Aedes aegypti* collected en urban Puerto Rico and rural Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*.10: 149-153.

Powell, J.R., 2018. Mosquito-Borne Human Viral Diseases: why *Aedes aegypti* *Am J Trop Med Hyg.* 98, 1563–1565.

Program in the southeast of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4(Suppl. 1): S73–80.
Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G: Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota,

Ramkumar G, Karthi S, Muthusamy R, Natarajan D, Shivakumar MS. Insecticidal and repellent activity of *Clausena dentata* (Rutaceae) plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (Diptera: Culicidae).

Ramkumar G, Shivakumar MS. Laboratory development of permethrin resistance and cross-resistance pattern of *Culex quinquefasciatus* to other Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, WC BI (2009) Insecticide resistance in dengue vectors. *Tropika.net Journal*.

Ramos-Nino, Maria E.; Fitzpatrick, Daniel M.; Eckstrom, Korin M.; Tighe, Scott; Hattaway, Lindsey M.; Hsueh, Andy N.; Stone, Diana M.; Dragon, Julie A.; Cheetham, Sonia; Leisnham, Paul T. (2020). Metagenomic analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Grenada, West Indies.

Reiter P., Amador M. A., Anderson R. A. Y G. G. Clark. 1995. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood-feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:177-179.

Reiter, P.; Gubler, D.J. 1999. Surveillance and control of urban dengue vectors. En Gubler, D.J. y Kuno, G. (eds.). *Dengue and Dengue Hemorrhagic*. CAB international. Wallingford, U.K. P425- 462. C20.

Reyes-Villanueva F. 1990. El dengue. *Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México*. *Ciencia* 41: 45-55.

Rodríguez M, Terán M, Lazcano J, Leyva Y, Pacheco L, López I. Eficacia de Pyriproxyfeno en cepas de referencia de *Aedes aegypti* susceptible y resistente a temefos. Revista cubana de Medicina Tropical.

Rodríguez, M. M., Ruiz, A., Piedra, L., Gutierrez, G., Rey, J., Cruz, M., y Bisset, J. A. (2020). Resistencia múltiple a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del municipio de Boyeros, Cuba y mecanismos asociados. Acta Tropica, 212, 105680.

Roiz, D., Wilson, A. L., Scott, T. W., Fonseca, D. M., Jourdain, F., Müller, P. Corbel, V. (2018). Integrated *Aedes* management for the control of Aedes-borne diseases. PLOS Neglected Tropical Diseases, 12(12).

Rozeboom LE: The relation of bacteria and bacterial filtrates to the development of Shannon y Putnam. 1934. The biology of *Stegomyia* under laboratory conditions. I the analysis of factors which influence larval development. Proc. Ent. Soc. Wash.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol 12, R60 (2011).

Shepard D, Undurraga E, Halasa Y, Stanaway J. The global economic burden of dengue: a systematic analysis.

Shin, SC, Kim, SH, You, H., Kim, B., Kim, AC, Lee, KA, Yoon, JH, Ryu, JH, Lee, WJ (2011) El microbioma de *Drosophila modula* la homeostasis metabólica y del desarrollo del huésped a través de la insulina señalización. Science 334: 670-674. 666.

Smith-Grenier, L. L. & Adkins, A. Aislamiento y caracterización de microorganismos del suelo capaces de utilizar el herbicida diclofopmethy como única fuente de carbono y energía. Revista Canadiense de Microbiología 42, 221-226 (1996).

Strand, M. R. (2018). Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. Current Opinion in Insect Science, 28, 59–65.

Strand, Michael R. (2017). Vector de artrópodos: controlador de la transmisión de enfermedades, volumen 1, La microbiota intestinal de los mosquitos, 185-199.

Sztankay-Gulyás M (1972) Mosquito control with integrated method. Wiadomosci Parazytologiczne, Temephos resistance in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Plos Negl

Takeshita, K.; Kikuchi, Y. Riptortus pedestris y Burkholderia symbiont: un sistema modelo ideal para asociaciones simbióticas de insectos y microbios. Res. Microbiol. 2017, 168, 175–187.

Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. Am J Trop Med Hyg.

Thanispong K, Sathantriphop S, Chareonviriyaphap T. Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand.

The American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2016; 95: 1169–1173.

Wei G, Lai Y, Wang G, Chen H, Li F, Wang S. El hongo patógeno de insectos interactúa con la microbiota intestinal para acelerar la mortalidad de los mosquitos. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017.

WHO (World Health Organization), 2018. Vacuna contra el dengue. https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/PP_dengue_2018_SP.pdf.

WHO (World Health Organization), 2019. Insect-Borne Diseases. https://www.who.int/whr/1996/media_centre/executive_summary1/en/index9.html.

Wilke ABB, Marrelli MT. Paratransgénesis: una nueva estrategia prometedora para el control de vectores de mosquitos. Vectores parásitos. 2015; 8: 342.

World Health Organization. (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization. X, 147 p. P

Wotton RS, Chaloner DT, Yardley CA, Merritt RW: Growth of Anopheles mosquito Wp on mosquitoes, and community acceptance, in eastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public

Y. Kikuchi et al., Symbiont-mediated insecticide resistance. Proceedings of the National Academy 598 of Sciences of the United States of America 109, (2012).

Yadav, K. K., Datta, S., Naglot, A., Bora, A., Hmuaka, V., Bhagyawant, S., ... Raju, P. S. (2016). Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India.

Yadav, Kamlesh K.; Bora, Ajitabh; Datta, Sibnarayan; Chandel, Kshitij; Gogoi, Hemant K.; Prasad, G. B. K. S.; Veer, Vijay (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. Parasites & Vectors, 8(1), 641

Zheng Hua Amelia-Yap, Chee Dhang Chen, Mohd Sofian-Azirun and Van Lun Low, Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management, Amelia-Yap et al. Parasites & Vectors (2018) 11:332

ANEXO

Comunidades microbianas de larvas a nivel phylum de *Ae. aegypti*

TEMEFOS VIVOS	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Firmicutes	0.03%
Cyanobacteria	0.07%
Bacteroidetes	12.03%
Actinobacteria	19.30%
Proteobacteria	68.60%
Total	100.03%

TEMEFOS MUERTOS	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Firmicutes	0.07%
Bacteroidetes	3.83%
Actinobacteria	37.20%
Proteobacteria	58.90%
Total	100.00%

CIS-PERMETRINA VIVOS	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Armatimonadetes	0.10%
Chlorobi	0.10%
Firmicutes	0.10%
Actinobacteria	1.37%
Otro	1.40%
Bacteroidetes	26.57%
Proteobacteria	70.40%
Total	100.03%

CIS-PERMETRINA MUERTOS	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Firmicutes	0.10%
Otro	0.13%
Actinobacteria	4.03%
Bacteroidetes	21.20%
Proteobacteria	74.53%
Total	100.00%

CAMPO	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Armatimonadetes	0.03%
Fibrobacteres	0.03%
Gemmatimonadetes	0.03%
ND	0.03%
Cyanobacteria	0.13%
Verrucomicrobia	0.33%
Acidobacteria	0.37%
Saccharibacteria	0.37%
Otro	0.70%
Chloroflexi	2.97%
Planctomycetes	3.33%
Firmicutes	3.50%
Actinobacteria	3.73%
Bacteroidetes	12.30%
Proteobacteria	72.10%
Total	99.97%

NEW ORLEANS	
PHYLUM	ABUNDANCIA
Otro	0.03%
Firmicutes	0.03%
Actinobacteria	3.07%
Bacteroidetes	42.97%
Proteobacteria	53.90%
	100.00%

Comunidades microbianas de larvas a nivel familia de *Ae. aegypti*

TEMEFOS VIVOS	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Rhodospirillaceae	0.03%
Methylophilaceae	0.03%
Neisseriaceae	0.03%
Chitinophagaceae	0.07%
Prototheca wickerhamii	0.07%
Bacteroidaceae	0.10%
Sphingobacteriaceae	0.10%
Brucellaceae	0.10%
Acetobacteraceae	0.23%
Pseudomonadaceae	0.33%
Rhizobiaceae	0.40%
Bradyrhizobiaceae	0.47%
Caulobacteraceae	0.67%
Methylobacteriaceae	1.30%
Flavobacteriaceae	2.03%
Sphingomonadaceae	2.27%
Rhodocyclaceae	2.53%
Burkholderiaceae	2.63%
Moraxellaceae	4.03%
Betaproteobacteria_NA_NA	5.10%
Cytophagaceae	9.67%
Microbacteriaceae	19.23%
Comamonadaceae	48.33%
Total	99.77%

TEMEFOS MUERTOS	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Lachnospiraceae	0.03%
Rhizobiaceae	0.03%
Bacteroidaceae	0.07%
Clostridiaceae	0.07%
Caulobacteraceae	0.17%
Xanthobacteraceae	0.30%
Acetobacteraceae	0.30%
Pseudomonadaceae	0.30%
Rhodocyclaceae	0.73%
Burkholderiaceae	0.77%
Bradyrhizobiaceae	1.20%
Sphingomonadaceae	1.23%
Flavobacteriaceae	1.60%
Cytophagaceae	2.13%
Betaproteobacteria_NA_NA	4.83%
Methylobacteriaceae	5.53%
Moraxellaceae	6.83%
Comamonadaceae	36.63%
Microbacteriaceae	37.17%
Total	99.93%

CIS-PERMETRINA VIVOS	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Mycobacteriaceae	0.03%
Nocardiaceae	0.03%
Cryomorphaceae	0.03%
Bacillaceae	0.03%
Clostridiaceae	0.03%
Lachnospiraceae	0.03%
Bradyrhizobiaceae	0.03%
Bacteriovoracaceae	0.03%
Chitinophagaceae	0.07%
Armatimonadetes_NA_NA_N	0.10%
Chlorobiales_NA	0.10%
Rhizobiaceae	0.10%
Sphingobacteriaceae	0.13%
Xanthomonadaceae	0.23%
Methylobacteriaceae	0.33%
Xanthobacteraceae	0.33%
Oxalobacteraceae	0.33%
Pseudomonadaceae	0.43%
Burkholderiaceae	0.47%
Rhodocyclaceae	0.80%
Methylophilaceae	1.03%
Microbacteriaceae	1.30%
Sphingomonadaceae	1.53%
Alcaligenaceae	1.90%
Nevskiaceae	2.37%
Rhodospirillaceae	4.57%
Moraxellaceae	4.57%
Enterobacteriaceae	5.17%
Flavobacteriaceae	11.27%
Cytophagaceae	15.00%
Caulobacteraceae	15.70%
Comamonadaceae	30.33%
Total	98.43%

CIS-PERMETRINA MUERTOS	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Bacillaceae	0.03%
Bradyrhizobiaceae	0.03%
Clostridiaceae	0.07%
Sphingobacteriaceae	0.10%
Caulobacteraceae	0.10%
Oxalobacteraceae	0.10%
Otro	0.13%
_Xanthomonadaceae	0.13%
Rhizobiaceae	0.30%
Methylobacteriaceae	0.47%
Burkholderiaceae	0.57%
Neisseriaceae	0.57%
Aeromonadaceae	0.67%
Sphingomonadaceae	0.90%
Alcaligenaceae	1.93%
Microbacteriaceae	4.00%
Cytophagaceae	8.80%
Moraxellaceae	9.90%
Pseudomonadaceae	10.57%
Comamonadaceae	12.23%
Flavobacteriaceae	12.33%
Enterobacteriaceae	36.00%
Total	99.93%

CAMPO	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Actinomycetaceae	0.03%
Cryptosporangiaceae	0.03%
Nakamurellaceae	0.03%
Bogoriellaceae	0.03%
Propionibacteriaceae	0.03%
Armatimonadetes_NA_NA_NA	0.03%
Sphingobacteriales_NA	0.03%
Acutodesmus obliquus_NA	0.03%
Fibrobacteraceae	0.03%
Enterococcaceae	0.03%
Family XI	0.03%
Gracilibacteraceae	0.03%
Peptococcaceae	0.03%
Erysipelotrichaceae	0.03%
Firmicutes_NA_NA_NA	0.03%
Gemmatimonadaceae	0.03%
Bacteria;_NA_NA_NA_NA	0.03%
Phycisphaerae_NA_NA	0.03%
Beijerinckiaceae	0.03%
Hyphomicrobiaceae	0.03%
Betaproteobacteria_NA_NA	0.03%
Bdellovibrionaceae	0.03%
Enterobacteriaceae	0.03%
Legionellaceae	0.03%
Proteobacteria_NA_NA_NA	0.03%
Verrucomicrobia_NA_NA_NA	0.03%
Rhodothermaceae	0.07%
Saprospiraceae	0.07%
Sphingobacteriaceae	0.07%
Oophila amblystomatis	0.07%
Halobacteroidaceae	0.07%
Veillonellaceae	0.07%
Burkholderiales_NA	0.07%
Bacteriovoracaceae	0.07%
Deltaproteobacteria_NA_NA	0.07%
Opitutaceae	0.07%
Acidimicrobiales_NA	0.10%
Cellulomonadaceae	0.10%
Bacteroidaceae	0.10%
Cryomorphaceae	0.10%
Methylobacteriaceae	0.10%

FAMILIA	ABUNDANCIA
Syntrophobacteraceae	0.10%
Rhizobiales_NA	0.13%
Sporichthyaceae	0.17%
Xanthomonadaceae	0.17%
Erythrobacteraceae	0.20%
Thermomicrobia_NA_NA	0.23%
Lachnospiraceae	0.23%
Nocardiodaceae	0.27%
Bacillaceae	0.27%
Planococcaceae	0.27%
Peptostreptococcaceae	0.30%
Verrucomicrobiaceae	0.30%
Solirubrobacterales_NA	0.33%
Cytophagaceae	0.33%
Caulobacteraceae	0.33%
Oxalobacteraceae	0.33%
Acidobacteria_NA_NA	0.37%
Moraxellaceae	0.37%
Saccharibacteria_NA_NA_NA	0.37%
Caldilineaceae	0.40%
Methylocystaceae	0.40%
Actinobacteria_NA_NA	0.47%
Chloroflexaceae	0.47%
Clostridiales_NA	0.47%
Chitinophagaceae	0.50%
Rhodospirillaceae	0.50%
Nocardiaceae	0.53%
Ruminococcaceae	0.57%
Otro	0.70%
Mycobacteriaceae	0.73%
Anaerolineaceae	0.77%
Methylophilaceae	0.83%
Microbacteriaceae	0.90%
Bradyrhizobiaceae	0.90%
Pseudomonadaceae	0.90%
Clostridiaceae	0.97%
Flavobacteriaceae	1.10%
Chloroflexi_NA_NA_NA	1.13%
Burkholderiaceae	1.50%
Rhodobacteraceae	1.53%
Xanthomonadales_NA	2.23%
Xanthobacteraceae	2.70%
Rhizobiaceae	3.17%
Planctomycetaceae	3.33%
Acetobacteraceae	3.60%
Sphingomonadaceae	5.90%
Porphyromonadaceae	9.90%
Comamonadaceae	13.23%
Rhodocyclaceae	32.33%
Total	99.77%

NEW ORLEANS	
FAMILIA	ABUNDANCIA
Otro	0.03%
Cytophagaceae	0.03%
Clostridiaceae	0.03%
Methylobacteriaceae	0.03%
Oxalobacteraceae	0.03%
Pseudomonadaceae	0.10%
Rhizobiaceae	0.17%
Rhodospirillaceae	0.17%
Aeromonadaceae	0.30%
Caulobacteraceae	1.20%
Sphingomonadaceae	1.43%
Xanthomonadaceae	1.43%
Sphingobacteriaceae	1.63%
Microbacteriaceae	3.03%
Comamonadaceae	14.73%
Moraxellaceae	15.77%
Enterobacteriaceae	18.57%
Flavobacteriaceae	41.30%
Total	100.00%

Comunidades microbianas de larvas a nivel familia de *Ae. aegypti*

TEMEFOS VIVOS	
ESPECIE	ABUNDANCIA
<i>Leucobacter chromiireducens tardus</i>	0.03%
<i>Leucobacter iarius</i>	0.03%
<i>Lysinimonas sp</i>	0.03%
<i>Chryseobacterium ginsengisoli indologenes</i>	0.03%
<i>Azospirillum sp</i>	0.03%
<i>Sphingomonas sp</i>	0.03%
<i>Sphingomonas aquatilis-hunanensis melonis</i>	0.03%
<i>Curvibacter delicatus</i>	0.03%
<i>Variovorax sp</i>	0.03%
<i>Methylophilus luteus methylotrophus</i>	0.03%
<i>Vogesella perlucida</i>	0.03%
<i>Azonexus hydrophilus</i>	0.03%
<i>Acinetobacter baumannii calcoaceticus</i>	0.03%
<i>Pseudomonas monteilii putida taiwanensis</i>	0.03%
<i>Sediminibacterium salmoneum</i>	0.07%
<i>Prototheca wickerhamii_NA_sp</i>	0.07%
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0.07%
<i>Rhizobium rhizoryzae</i>	0.07%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.07%
<i>Polynucleobacter asymbioticus necessarius sp</i>	0.07%
<i>Aquabacterium niu</i>	0.07%
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.10%
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0.10%
<i>Afipia-Bradyrhizobium sp</i>	0.10%
<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum lubricantis saccharolyticum</i>	0.10%
<i>Sphingomonas sp</i>	0.10%
<i>Leifsonia lichenia</i>	0.13%
<i>Methylobacterium aquaticum platani tarhaniae</i>	0.13%
<i>Caulobacter crescentus segnis vibrioides</i>	0.17%
<i>Sphingomonas melonis</i>	0.17%
<i>Agrobacterium Rhizobium radiobacter tumefaciens</i>	0.20%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.23%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.27%
<i>Pseudomonas otitidis</i>	0.27%

<i>Microbacterium ginsengiterrae paraoxydans</i>	0.30%
<i>Sphingobium limneticum</i>	0.33%
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	0.33%
<i>Ralstonia insidiosa</i>	0.33%
<i>Acinetobacter calcoaceticus pittii</i>	0.33%
<i>Bradyrhizobiaceae_NA_sp</i>	0.37%
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	0.50%
<i>Aquabacterium parvum</i>	0.50%
<i>Sphingomonas alpina echinoides glacialis</i>	0.60%
<i>Dechloromonas sp</i>	0.60%
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i>	0.60%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.60%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	0.70%
<i>Methylobacterium sp</i>	1.17%
<i>Chryseobacterium zeae</i>	1.33%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	1.43%
<i>Microbacterium maritypicum oxydans</i>	1.47%
<i>Rhodocyclaceae_NA_sp</i>	1.87%
<i>Ralstonia pickettii</i>	2.20%
<i>Curvibacter lanceolatus</i>	2.97%
<i>Acinetobacter soli</i>	3.63%
<i>Betaproteobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	5.10%
<i>Flectobacillus major</i>	9.67%
<i>Microbacterium hominis laevaniformans</i>	16.60%
<i>Delftia lacustris tsuruhatensis</i>	18.00%
<i>Pseudacidovorax intermedius</i>	24.97%
Total	99.50%

TEMEFOS MUERTOS	
ESPECIE	ABUNDANCIA
<i>Prostheco bacter debontii</i>	0.00%
<i>Agromyces mediolanus soli</i>	0.03%
<i>Clostridium beijerinckii diolis saccharoperbutylaceticum</i>	0.03%
<i>kachnoclostridium sp</i>	0.03%
<i>Caulobacter Phenylobacterium koreense-vibrioides</i>	0.03%
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	0.03%
<i>Rhodopseudomonas pentothentaxigens</i>	0.03%
<i>Rhizobium rhizoryzae</i>	0.03%
<i>Sphingomonas insulae kyungheensis sanxanigenens</i>	0.03%
<i>Sphingomonas sp</i>	0.03%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Rhizobacter Variovorax fulvus sp</i>	0.03%
<i>Variovorax sp</i>	0.03%
<i>Pseudomonas plecoglossicida putida</i>	0.03%
<i>Cryobacterium-Leifsonia lichenia psychrotolerans</i>	0.07%
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.07%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	0.07%
<i>Ancylobacter aquaticus</i>	0.07%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.07%
<i>Sphingobium limneticum</i>	0.07%
<i>Azonexus hydrophilus</i>	0.07%
<i>Methylobacterium aquaticum platani tarhaniae</i>	0.10%
<i>Pseudomonas otitidis</i>	0.10%
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	0.13%
<i>Rubritepida flocculans</i>	0.13%
<i>Afipia Bradyrhizobium sp</i>	0.17%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.17%
<i>Sphingomonas alpina echinoides glacialis</i>	0.17%
<i>Sphingomonas melonis</i>	0.17%
<i>Acinetobacter calcoaceticus pittii</i>	0.20%
<i>Pseudomonas putida</i>	0.20%
<i>Leifsonia lichenia</i>	0.23%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.23%
<i>Xanthobacter autotrophicus flavus</i>	0.27%
<i>Microbacterium ginsengiterrae paraoxydans</i>	0.40%
<i>Curvibacter lanceolatus</i>	0.40%
<i>Leucobacter iarius</i>	0.43%
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i>	0.60%

<i>Novosphingobium sp</i>	0.63%
<i>Rhodocyclaceae_NA_sp</i>	0.63%
<i>Aquabacterium parvum</i>	0.70%
<i>Ralstonia pickettii</i>	0.77%
<i>Bradyrhizobiaceae_NA_sp</i>	0.93%
<i>Chryseobacterium zeae</i>	1.53%
<i>Flectobacillus major</i>	2.13%
<i>Microbacterium maritypicum oxydans</i>	2.90%
<i>Betaproteobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	4.83%
<i>Methylobacterium sp</i>	5.43%
<i>Acinetobacter soli</i>	6.57%
<i>Delftia lacustris tsuruhatensis</i>	7.53%
<i>Pseudacidovorax intermedius</i>	27.60%
<i>Microbacterium hominis laevaniformans</i>	32.53%
Total	99.73%

CIS-PEREMETRINA VIVOS	
ESPECIE	ABUNDANCIA
<i>Mycobacterium rhodesiae</i>	0.03%
<i>Gordonia terrae</i>	0.03%
<i>Fluviicola taffensis</i>	0.03%
<i>Flavobacterium sp</i>	0.03%
<i>Mucilaginibacter lutimaris</i>	0.03%
<i>Bacillus cereus pseudomycooides toyonensis</i>	0.03%
<i>Lachnoclostridium sp</i>	0.03%
<i>Afipia Bradyrhizobium sp</i>	0.03%
<i>Agrobacterium-Rhizobium radiobacter tumefaciens</i>	0.03%
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0.03%
<i>Rhizobium rhizoryzae</i>	0.03%
<i>Xanthobacter autotrophicus flavus</i>	0.03%
<i>Curvibacter Variovorax sp</i>	0.03%
<i>Hydrogenophaga bisanensis pseudoflava</i>	0.03%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Rhizobacter Variovorax fulvus</i>	0.03%
<i>Rhodoferax ferrireducens sp</i>	0.03%
<i>Zoogloea resiniphila</i>	0.03%
<i>Zoogloea sp</i>	0.03%
<i>Peredibacter sp</i>	0.03%
<i>Escherichia Shigella coli</i>	0.03%
<i>Pseudomonas oryzihabitans psychrotolerans</i>	0.03%
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	0.03%
<i>Microbacterium ginsengiterrae paraoxydans</i>	0.07%
<i>Hymenobacter flocculans</i>	0.07%
<i>Sediminibacterium salmoneum</i>	0.07%
<i>Sphingomonas aquatilis hunanensis melonis</i>	0.07%
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	0.07%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Methyloversatilis universalis</i>	0.07%
<i>Zoogloe caeni</i>	0.07%
<i>Panacagrimonas sp</i>	0.07%
<i>Microbacterium aerolatum</i>	0.10%
<i>Microbacterium maritypicum oxydans</i>	0.10%
<i>Armatimonadetes_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.10%
<i>Spirosoma panaciterrae</i>	0.10%
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0.10%
<i>Chlorobiales_NA_NA_sp</i>	0.10%

<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	0.10%
<i>Caulobacter crescentus segnis vibrioides</i>	0.10%
<i>Ralstonia pickettii</i>	0.10%
<i>Acidovorax temperans</i>	0.10%
<i>Enterobacter asburiae</i>	0.10%
<i>Microbacterium natoriense testaceum</i>	0.13%
<i>Enterobacter cloacae ludwigii sp</i>	0.13%
<i>Flavobacterium squillarum</i>	0.17%
<i>Methylobacterium sp</i>	0.17%
<i>Methylobacterium aquaticum platani tarhaniae</i>	0.17%
<i>Pseudomonas sp</i>	0.17%
<i>Pseudomonas otitidis</i>	0.17%
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i>	0.20%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.20%
<i>Lysinimonas sp</i>	0.23%
<i>Pelomonas saccharophila</i>	0.23%
<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>	0.23%
<i>Zoogloea oryzae</i>	0.27%
<i>Azorhizobium Xanthobacter caulinodans polyaromaticivorans</i>	0.30%
<i>Microbacterium hominis laevaniformans</i>	0.33%
<i>Undibacterium squillarum</i>	0.33%
<i>Azonexus caeni</i>	0.33%
<i>Acinetobacter baylyi</i>	0.33%
<i>Limnobacter thiooxidans</i>	0.37%
<i>Rhizobacter bergeniae</i>	0.37%
<i>Sphingomonas sp</i>	0.40%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.47%
<i>Leptothrix cholodnii</i>	0.50%
<i>Enterobacter cloacae ludwigii</i>	0.50%
<i>Serratia marcescens</i>	0.50%
<i>Acinetobacter soli</i>	0.87%
<i>Sphingomonas alpina echinoides glacialis</i>	0.97%
<i>Pseudacidovorax intermedius</i>	1.00%
<i>Methylophilaceae_NA_sp</i>	1.00%
<i>Niveispirillum sp</i>	1.10%
<i>Variovorax paradoxus</i>	1.33%
<i>Otro</i>	1.40%
<i>Bordetella hinzii petrii</i>	1.90%
<i>Nevskia ramosa</i>	2.13%
<i>Acidovorax delafieldii</i>	2.63%

<i>Acinetobacter calcoaceticus pittii</i>	3.40%
<i>Azospirillum sp</i>	3.43%
<i>Serratia marcescens nematodiphila</i>	3.50%
<i>Aquabacterium parvum</i>	3.97%
<i>Chryseobacterium zeae</i>	4.10%
<i>Delftia lacustris tsuruhatensis</i>	5.30%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	6.97%
<i>Acidovorax cattleyae citrulli</i>	14.63%
<i>Flectobacillus major</i>	14.83%
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	15.47%
Total	99.60%

CIS-PERMETRINA MUERTOS	
GENERO	ABUNDANCIA
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.03%
<i>Bacillus cereus pseudomycooides toyonensis</i>	0.03%
<i>Afipia Bradyrhizobium NA</i>	0.03%
<i>Sphingomonas melonis</i>	0.03%
<i>Acidovorax temperans</i>	0.03%
<i>Leptothrix ginsengisoli</i>	0.03%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Pseudacidovorax intermedius</i>	0.03%
<i>Enterobacter cloacae ludwigii</i>	0.03%
<i>Pseudomonas monteilii putida taiwanensis</i>	0.03%
<i>Clostridium perfringens</i>	0.07%
<i>Methylobacterium sp</i>	0.07%
<i>Acidovorax delafieldii</i>	0.07%
<i>Enterobacter hormaechei ludwigii</i>	0.07%
<i>Escherichia Shigella coli</i>	0.07%
<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	0.10%
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	0.10%
<i>Massilia aerilata consociata</i>	0.10%
<i>Enterobacter asburiae</i>	0.10%
Otro	0.13%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.13%
<i>Methylobacterium aquaticum platani tarhaniae</i>	0.17%
<i>Salmonella enterica</i>	0.17%
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	0.20%
<i>Comamonas testosteroni thiooxydans</i>	0.20%
<i>Aeromonas encheleia hydrophila molluscorum</i>	0.20%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.20%
<i>Methylobacterium sp</i>	0.23%
<i>Rhizobium rhizoryzae</i>	0.30%
<i>Microbacterium hominis laevaniformans</i>	0.43%
<i>Leptothrix cholodnii</i>	0.43%
<i>Aquabacterium parvum</i>	0.47%
<i>Aeromonas media tecta</i>	0.47%
<i>Acinetobacter baylyi</i>	0.50%
<i>Chryseobacterium zeae</i>	0.53%
<i>Ralstonia insidiosa</i>	0.57%
<i>Vogesella perlucida</i>	0.57%

<i>Sphingomonas alpina echinoides glacialis</i>	0.67%
<i>Acidovorax cattleyae citrulli</i>	0.70%
<i>Microbacterium ginsengiterrae paraoxydans</i>	0.73%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	0.90%
<i>Acinetobacter soli</i>	1.30%
<i>Enterobacter sp</i>	1.50%
<i>Bordetella hinzii petrii</i>	1.93%
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i>	2.77%
<i>Serratia marcescens</i>	4.33%
<i>Acinetobacter calcoaceticus pittii</i>	8.10%
<i>Flectobacillus major</i>	8.80%
<i>Delftia lacustris tsuruhatensis</i>	10.13%
<i>Pseudomonas otitidis</i>	10.50%
<i>Chryseobacterium ginsengisoli indologenes</i>	10.90%
<i>Serratia marcescens nematodiphila</i>	29.50%
Total	99.77%

NEW ORLEANS	
ESPECIE	ABUNDANCIA
<i>Otro</i>	0.03%
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	0.03%
<i>Caulobacter crescentus segnis vibrioides</i>	0.03%
<i>Methylobacterium aquaticum platani tarhaniae</i>	0.03%
<i>Sphingomonas melonis</i>	0.03%
<i>Massilia consociata</i>	0.03%
<i>Enterobacter cloacae ludwigii</i>	0.03%
<i>Aeromonas encheleia hydrophila molluscorum</i>	0.07%
<i>Escherichia Shigella coli</i>	0.07%
<i>Comamonas testosteroni thiooxydans</i>	0.10%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.10%
<i>Enterobacter cloacae ludwigii</i>	0.10%
<i>Pseudomonas sp</i>	0.10%
<i>Leptothrix cholodnii</i>	0.13%
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0.17%
<i>Azospirillum sp</i>	0.17%
<i>Acidovorax delafieldii</i>	0.23%
<i>Aeromonas media tecta</i>	0.23%
<i>Sphingomonadaceae Sphingomonas</i>	0.33%
<i>Flavobacterium sp</i>	0.47%
<i>Enterobacter ludwigii</i>	0.47%
<i>Pseudoclavibacter chungangensis</i>	0.80%
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	1.07%
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	1.10%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.43%
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.63%
<i>Leucobacter iarius</i>	2.23%
<i>Serratia marcescens</i>	2.63%
<i>Chryseobacterium hagamense</i>	2.73%
<i>Acinetobacter baylyi</i>	2.93%
<i>Delftia lacustris tsuruhatensis</i>	3.43%
<i>Acinetobacter calcoaceticus pittii</i>	5.63%
<i>Acinetobacter soli</i>	7.23%
<i>Acidovorax cattleyae citrulli</i>	10.80%
<i>Serratia marcescens nematodiphila</i>	15.17%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	38.13%
Total	99.93%

CAMPO	
ESPECIE	ABUNDANCIA
<i>Verrucomicrobiaceae_NA_sp</i>	0.00%
<i>Acidobacteria_NA_NA_Bryobacter_sp</i>	0.03%
<i>Acidobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Acidimicrobiales_NA_Microthrix_sp</i>	0.03%
<i>Actinomyces cf</i>	0.03%
<i>Gordonia terrae</i>	0.03%
<i>Fodinicola sp</i>	0.03%
<i>Nakamurella sp</i>	0.03%
<i>Georgenia sp</i>	0.03%
<i>Actinotalea Cellulomonas bogoriensis fermentans ferrariae</i>	0.03%
<i>Cellulomonas hominis parahominis</i>	0.03%
<i>Cellulomonas hominis parahominis uda</i>	0.03%
<i>Cellulomonas oligotrophica</i>	0.03%
<i>Chryseoglobus frigidaquae</i>	0.03%
<i>Leucobacter sp</i>	0.03%
<i>Lysinimonas Pseudoclavibacter helvolus sp</i>	0.03%
<i>Microbacterium aoyamense pumilum</i>	0.03%
<i>Microbacterium ginsengiterrae paraoxydans</i>	0.03%
<i>Actinobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Propionicimonas paludicola</i>	0.03%
<i>Armatimonadetes_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Porphyromonadaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Flectobacillus major</i>	0.03%
<i>Leadbetterella sp</i>	0.03%
<i>Ohtaekwangia sp</i>	0.03%
<i>Cloacibacterium normanense</i>	0.03%
<i>Flavobacterium caeni</i>	0.03%
<i>Flavobacterium caeni sp</i>	0.03%
<i>Flavobacterium daemonense</i>	0.03%
<i>Flavobacterium lindanitolerans</i>	0.03%
<i>Flavobacterium sp</i>	0.03%
<i>Flavobacterium sp</i>	0.03%
<i>Flavobacterium squillarum</i>	0.03%
<i>Cnuella takakiae</i>	0.03%
<i>Flaviumibacter cheonanensis</i>	0.03%
<i>Chitinophagaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Chitinophagaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Chitinophagaceae_NA_sp</i>	0.03%

<i>Sphingobacteriales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	0.03%
<i>Pedobacter glucosidilyticus</i>	0.03%
<i>Pedobacter insulae</i>	0.03%
<i>Anaerolineaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Chloroflexi_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Thermomicrobia_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Thermomicrobia_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Thermomicrobia_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Acutodesmus obliquus_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Fibrobacteraceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Bacillus beringensis koreensis korlensis</i>	0.03%
<i>Bacillus nealsonii sp</i>	0.03%
<i>Lysinibacillus composti</i>	0.03%
<i>Enterococcus sp</i>	0.03%
<i>Clostridium beijerinckii butyricum saccharoperbutylaceticum</i>	0.03%
<i>Clostridium butyricum</i>	0.03%
<i>Clostridium celatum</i>	0.03%
<i>Clostridium chromiireducens</i>	0.03%
<i>Clostridium novyi</i>	0.03%
<i>Clostridium pascui peptidivorans</i>	0.03%
<i>Sedimentibacter saalensis</i>	0.03%
<i>Lutispora sp</i>	0.03%
<i>Lachnospiraceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Fonticella sp</i>	0.03%
<i>Fonticella sp</i>	0.03%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Peptostreptococcaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Peptoclostridium sp</i>	0.03%
<i>Sporacetigenium mesophilum</i>	0.03%
<i>Terrisporobacter sp</i>	0.03%
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	0.03%
<i>Ruminococcaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Ruminococcaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Ruminiclostridium sp</i>	0.03%

<i>Turcibacter sanguinis</i>	0.03%
<i>Firmicutes_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Sporomusa aerivorans</i>	0.03%
<i>Sporomusa sp</i>	0.03%
<i>Gemmatimonas sp</i>	0.03%
<i>Phycisphaerae_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Gemmata sp</i>	0.03%
<i>Gemmata sp</i>	0.03%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Phenylobacterium haematophilum</i>	0.03%
<i>Camelimonas lactis</i>	0.03%
<i>Methylorosula sp</i>	0.03%
<i>Bradyrhizobium canariense lupini</i>	0.03%
<i>Hyphomicrobium Pedomicrobium sp</i>	0.03%
<i>Methylobacterium sp</i>	0.03%
<i>Rhizobiales_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Rhizobium rosettiformans vitis</i>	0.03%
<i>Shinella zoogloeoides</i>	0.03%
<i>Variibacter sp</i>	0.03%
<i>Xanthobacter tagetidis</i>	0.03%
<i>Defluviimonas Frigidibacter albus sp</i>	0.03%
<i>Gemmobacter fontiphilus</i>	0.03%
<i>Gemmobacter lanyuensis</i>	0.03%
<i>Rubellimicrobium mesophilum</i>	0.03%
<i>Rubellimicrobium mesophilum sp</i>	0.03%
<i>Rubellimicrobium sp</i>	0.03%
<i>Rubellimicrobium sp</i>	0.03%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Roseococcus sp</i>	0.03%
<i>Roseomonas lacus</i>	0.03%
<i>Azospirillum sp</i>	0.03%
<i>Altererythrobacter sp</i>	0.03%
<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	0.03%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.03%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.03%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.03%

<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	0.03%
<i>Sphingobium jiangsuense</i>	0.03%
<i>Sphingomonas aquatilis hunanensis melonis</i>	0.03%
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	0.03%
<i>Sphingopyxis terrae ummariensis</i>	0.03%
<i>Acidovorax delafieldii</i>	0.03%
<i>Aquabacterium fontiphilum</i>	0.03%
<i>Chlorochromatium sp</i>	0.03%
<i>Hydrogenophaga atypica</i>	0.03%
<i>Hydrogenophaga bisanensis</i>	0.03%
<i>Polaromonas sp</i>	0.03%
<i>Variovorax soli</i>	0.03%
<i>Noviherbaspirillum sp</i>	0.03%
<i>Betaproteobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Accumulibacter sp</i>	0.03%
<i>Azoarcus olearius</i>	0.03%
<i>Azonexus caeni</i>	0.03%
<i>Azospira sp</i>	0.03%
<i>Dechloromonas sp</i>	0.03%
<i>Rhodocyclaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Rhodocyclaceae_NA_sp</i>	0.03%
<i>Peredibacter starrii</i>	0.03%
<i>Bdellovibrio sp</i>	0.03%
<i>Escherichia Shigella coli</i>	0.03%
<i>Legionella pneumophila</i>	0.03%
<i>Acinetobacter indicus radioresistens</i>	0.03%
<i>Acinetobacter schindleri</i>	0.03%
<i>Alkanindiges sp</i>	0.03%
<i>Pseudomonas knackmussii stutzeri</i>	0.03%
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	0.03%
<i>Arenimonas maotaiensis</i>	0.03%
<i>Pseudoxanthomonas daejeonensis</i>	0.03%
<i>Proteobacteria_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Saccharibacteria_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Saccharibacteria_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Saccharibacteria_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.03%
<i>Acidobacteria_NA_NA_Blastocatella_sp</i>	0.07%
<i>Acidimicrobiales_NA_NA_sp</i>	0.07%
<i>Mycobacterium_gadium thermoresistibile</i>	0.07%
<i>Rhodococcus artemisiae</i>	0.07%

<i>Rhodococcus gordoniae</i>	0.07%
<i>Rhodococcus rhodochrous-ruber</i>	0.07%
<i>Microbacterium Salinibacterium aurum xinjiangense</i>	0.07%
<i>Salinibacterium xinjiangense</i>	0.07%
<i>Actinobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.07%
<i>Rubrivirga sp</i>	0.07%
<i>Flavobacterium cheniae</i>	0.07%
<i>Parasegetibacter luojiensis</i>	0.07%
<i>Saprospiraceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Oophila amblystomatis_NA_sp</i>	0.07%
<i>Bacillus sp</i>	0.07%
<i>Oceanobacillus profundus</i>	0.07%
<i>Anaerosporobacter sp</i>	0.07%
<i>Mobilitalea sp</i>	0.07%
<i>Fonticella sp</i>	0.07%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.07%
<i>Ruminiclostridium sp</i>	0.07%
<i>Halobacteroidaceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Gemmata sp</i>	0.07%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Kaistia adipata</i>	0.07%
<i>Rhizobium rhizoryzae</i>	0.07%
<i>Ancylobacter aquaticus</i>	0.07%
<i>Paracoccus tibetensis</i>	0.07%
<i>Rhodobacter sp</i>	0.07%
<i>Rhodobacter sp</i>	0.07%
<i>Roseomonas; gilardii mucosa</i>	0.07%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.07%
<i>Sphingomonas koreensis</i>	0.07%
<i>Caenimonas sp</i>	0.07%
<i>Leptothrix sp</i>	0.07%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Rubrivivax benzoatilyticus gelatinosus</i>	0.07%
<i>Burkholderiales_NA_NA_sp</i>	0.07%
<i>Massilia sp</i>	0.07%
<i>Oxalobacteraceae_NA_sp</i>	0.07%
<i>Methylophilus luteus methylotrophus</i>	0.07%
<i>Dechloromonas agitata</i>	0.07%
<i>Deltaproteobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.07%

<i>k_Bacteria;p_Saccharibacteria;c_NA;o_NA;f_NA;g_NA;</i>	0.07%
<i>Actinobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.10%
<i>Aeromicrobium erythreum</i>	0.10%
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.10%
<i>Fluviicola hefeinensis</i>	0.10%
<i>Chryseobacterium zeae</i>	0.10%
<i>Sediminibacterium salmoneum</i>	0.10%
<i>Clostridiales_NA_NA_sp</i>	0.10%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.10%
<i>Rhizobiales_NA_NA_NA</i>	0.10%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.10%
<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i>	0.10%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.10%
<i>Zymomonas sp</i>	0.10%
<i>Methylophilus leisingeri</i>	0.10%
<i>Methyloversatilis universalis</i>	0.10%
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	0.10%
<i>Perlucidibaca sp</i>	0.10%
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	0.10%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.10%
<i>Mycobacterium arupense</i>	0.13%
<i>Nocardioides pyridinolyticus</i>	0.13%
<i>Flavobacterium indicum</i>	0.13%
<i>Chitinophagaceae_NA_sp</i>	0.13%
<i>Thermomicrobia_NA_NA_NA_sp</i>	0.13%
<i>Clostridium sartagoforme</i>	0.13%
<i>Clostridium tunisiense</i>	0.13%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.13%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.13%
<i>Rubritepida flocculans sp</i>	0.13%
<i>Novosphingobium sp</i>	0.13%
<i>Aquabacterium sp</i>	0.13%
<i>Aquabacterium Chlorochromatium sp</i>	0.13%
<i>Methylophilus sp</i>	0.13%
<i>Perlucidibaca piscinae</i>	0.13%
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	0.13%
<i>Sporichthya brevicatena polymorpha</i>	0.17%
<i>Microbacterium schleiferi</i>	0.17%
<i>Chloroploca sp</i>	0.17%
<i>Clostridium perfringens</i>	0.17%

<i>Kaistia geumhonensis</i>	0.17%
<i>Roseomonas sp</i>	0.17%
<i>Novispirillum sp</i>	0.17%
<i>Aquabacterium niu</i>	0.17%
<i>Undibacterium sp</i>	0.17%
<i>Pseudomonas plecoglossicida putida</i>	0.17%
<i>Saccharibacteria_NA_NA_NA_NA_sp</i>	0.17%
<i>Mycobacterium sp</i>	0.20%
<i>Chloroploca sp</i>	0.20%
<i>Romboutsia ilealis</i>	0.20%
<i>Pseudobacteroides cellulosolvans</i>	0.20%
<i>Rhodobacter sp</i>	0.20%
<i>Rudanella lutea</i>	0.23%
<i>Lysinibacillus fusiformis mangiferihumi</i>	0.23%
<i>Ruminococcaceae_NA_sp</i>	0.23%
<i>Brevundimonas bacteroides</i>	0.23%
<i>Bradyrhizobiaceae_NA_sp</i>	0.23%
<i>Rhodobacter sp</i>	0.23%
<i>Sphingopyxis contaminans</i>	0.23%
<i>Sphingopyxis italica macrogoltabida</i>	0.23%
<i>Aquabacterium parvum</i>	0.23%
<i>Hydrogenophaga flava</i>	0.23%
<i>Leptothrix ginsengisoli sp</i>	0.23%
<i>Comamonadaceae_NA_sp</i>	0.23%
<i>Piscinibacter aquaticus</i>	0.23%
<i>Pseudomonas guangdongensis</i>	0.23%
<i>Pseudomonas monteilii putida taiwanensis</i>	0.23%
<i>Blastocatella sp</i>	0.27%
<i>Actinobacteria_NA_NA_NA_sp</i>	0.27%
<i>Clostridium swellfunianum</i>	0.27%
<i>Planctomycetaceae_NA_sp</i>	0.27%
<i>Methylophilus methylotrophus</i>	0.27%
<i>Methylotenera mobilis</i>	0.27%
<i>Rhodococcus sp</i>	0.30%
<i>Defluviicoccus sp</i>	0.30%
<i>Prostheco bacter debontii</i>	0.30%
<i>Mycobacterium obuense</i>	0.33%
<i>Solirubrobacterales_NA_NA_sp</i>	0.33%
<i>Sphingopyxis sp</i>	0.33%
<i>Caldilineaceae_NA_sp</i>	0.40%

<i>Cupriavidus metallidurans pauculus</i>	0.43%
<i>Leucobacter denitrificans</i>	0.47%
<i>Rhodovarius sp</i>	0.47%
<i>Flavobacterium cheonhonense</i>	0.60%
<i>Bradyrhizobiaceae_NA_sp</i>	0.63%
<i>Aquabacterium sp</i>	0.63%
<i>Isosphaera sp</i>	0.67%
<i>Rhodobacter gluconicum</i>	0.67%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.67%
<i>Otro</i>	0.70%
<i>Anaerolineaceae_NA_sp</i>	0.73%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.73%
<i>Acetobacteraceae_NA_sp</i>	0.97%
<i>Limnobacter thiooxidans</i>	1.03%
<i>Chloroflexi_NA_NA_NA_NA_sp</i>	1.10%
<i>Pirellula sp</i>	1.73%
<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	2.07%
<i>Xanthomonadales_NA_NA_sp</i>	2.23%
<i>Novosphingobium sp</i>	2.33%
<i>Azorhizobium Xanthobacter caulinodans polyaromaticivorans</i>	2.53%
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	2.80%
<i>Dysgonomonas gadei sp</i>	9.87%
<i>Polaromonas Xenophilus arseniciresistens</i>	10.50%
<i>Rhodocyclaceae_NA_sp</i>	31.93%
Total	99.23%