

Caracterización de la fracción cultivable aeróbica de la microbiota ovárica de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia para el control biológico

Ochoa Agudelo Susana¹, Alvarado Wilber², Vélez Iván Dario²,
Vivero Gómez Rafael².

¹ Grupo de investigación Biociencias. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Sede de Investigación
Universitaria, Medellín, Colombia

Resumen. *Aedes (Stegomyia) aegypti* es el vector responsable de transmitir los virus que causan el Zika, el dengue y el chikungunya a la población humana. Los mosquitos tienen comunidades bacterianas en diferentes órganos, principalmente en el intestino medio, pero en menor medida en órganos reproductivos como los ovarios, en donde la replicación y la transmisión vertical es determinante para el virus dengue. Estas bacterias también influyen en procesos metabólicos y fisiológicos como la ingestión y digestión de la sangre. En el presente estudio se determinaron las comunidades bacterianas cultivables aeróbicas asociadas a ovarios de *A. aegypti* cepa Rockefeller. Grupos de hembras de mosquitos fueron separadas en tres tratamientos: dieta con solución azucarada al 10%, dieta con alimentación sanguínea y alimentación sanguínea combinada con Tetraciclina. Se realizó la extracción de los ovarios de los mosquitos y su inoculación directa en medios de cultivo (agar sangre y agar nutritivo), para un posterior aislamiento y purificación. La determinación taxonómica de los aislados bacterianos se logró por el análisis de secuencias del gen 16S rRNA. Se observó una mayor carga de bacterias en el grupo de alimentación azucarada (6×10^3 CFU/ml) en contraste con el grupo alimentado solo con sangre y el tratado con antibiótico ($4.03-4.04 \times 10^3$ CFU/ml; $4.85-5.04 \times 10^3$ CFU/ml). Como resultado, se aislaron un total de 35 colonias, de las cuales el 80% fueron Gram-negativas y 20% Gram-positivas. Se identificaron bacterias de los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Phytobacter* y *Microbacterium*. Bacterias aisladas como

Pantoea dispersa y *Serratia marcescens* tienen potencial biotecnológico por su amplio espectro de producción de metabolitos secundarios y la exploración de su uso para control biológico de insectos vectores.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, microbiota, ovarios, fracción cultivable, control biológico.

Introducción.

Aedes aegypti es un mosquito altamente antropofílico presente en regiones tropicales y subtropicales, y es el principal vector de enfermedades arbovirales como dengue, zika y chikungunya, por lo cual representa un enorme riesgo para la salud pública (Rey y Lounibos, 2015). Pese a la generación de suficiente conocimiento sobre la microbiota en *Aedes aegypti* enfocados a órganos clave como el intestino medio, existen pocos estudios sobre sobre la microbiota asociada a otros órganos importantes como glándulas salivales y órganos reproductivos (ovarios), los cuales son de interés por ser sitios de replicación de virus y porque la presencia de determinadas bacterias puede influir en el establecimiento y desplazamiento de otros simbioses con poder biológico y biotecnológico para el control vectorial del *A. aegypti* (Gusmão et al. 2010; Zouache et al. 2011; Yadav et al. 2015). Los contados estudios que existen, indican que la carga y riqueza bacteriana de estos órganos es menor comparada con el intestino medio, reportando únicamente las bacterias de los géneros *Asaia* y *Pantoea* como endosimbiontes presentes en estos órganos de *A. aegypti* (Gaio et al. 2011; Charan et al. 2016). Por los antecedentes anteriormente expuestos, es necesario profundizar en estudios que reporten la composición y dinámica de la microbiota de los ovarios y su potencial función en estos órganos. Es necesario justificar que los ovarios corresponden a un espacio donde se suministra una fuente determinante de proteínas para el desarrollo de los oocitos, y que durante el desarrollo de estos, se generan cambios estructurales y fisiológicos vitales para el ciclo de vida y supervivencia de *Aedes* (Gaio et al. 2011; Gonzales et al. 2015). Adicionalmente, no se conoce el potencial biológico de las bacterias asociadas a

los ovarios de *A. aegypti*, siendo un área de estudio inexplorada, que permitiría entender mejor la interacción mosquito-microbiota para implementar nuevos métodos de control biológico del vector, ante el aumento de casos y la amplia distribución del mosquito por su capacidad de adaptación.

Objetivo.

Esta investigación aporta nuevo conocimiento sobre la identificación de comunidades bacterianas asociada a la fracción cultivable aeróbica de ovarios en *A. aegypti* bajo diferentes regímenes de alimentación mediante métodos dependientes de cultivo.

Metodología.

Una línea de la colonia de *A. aegypti* cepa Rockefeller establecida en el insectario de la Unidad de Entomología Médica del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Universidad de Antioquia, fue seleccionada.

Tres jaulas con las hembras fueron categorizadas de la siguiente forma: SA que corresponde al grupo de hembras alimentadas únicamente con una dieta de solución azucarada estéril al 10% durante 48 horas; el segundo grupo identificado como AS fue alimentado con solución azucarada estéril al 10% durante 48 horas y seguido de una posterior alimentación con sangre humana, mediante el uso de pomos impregnados con 6 ml de sangre durante 45 minutos; el tercer grupo identificado como AA fue alimentado con solución azucarada al 10% + 200 µl de Tetraciclina durante 48 horas y posterior alimentación con sangre en pomos impregnados con 6 ml de sangre durante 45 minutos. Se procesaron 15 individuos por cada grupo siguiendo el protocolo de disección de ovarios bajo el estereoscopio. De cada tratamiento se contemplaron muestras por triplicado, cada una con 5 ovarios resuspendidos en 100 µl de PBS. La siembra directa de los ovarios se realizó de forma inmediata posterior a la extracción. Se inocularon 100 µl en Agar Sangre y 50 µl en Agar CASO de los homogenizados oviales

asociados a cada tratamiento. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 y 48 horas bajo condiciones aeróbicas. El aislamiento de colonias se realizó por el método de siembra por agotamiento en agar nutritivo. El ADN de cada aislados se obtuvo utilizando el protocolo descrito por el PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA). El gen 16s rRNA fue amplificado con los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Janssen 2006). Se realizaron comparaciones de similaridad con secuencias de referencia de GenBank y RDP (Ribosomal Database Project) usando BLASTN (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmar la identidad taxonómica del fragmento obtenido con el ≥ 97 % de similaridad.

Resultados.

El grupo de ovarios de hembras alimentadas con solución azucarada (SA) presentó un mayor crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) con 6×10^3 , mientras que para el grupo de ovarios de hembras alimentadas solo con sangre (AA) se vió reducido la carga bacteriana entre $4.03 - 4.04 \times 10^3$ (UFC/ml), al igual que el grupo de hembras alimentadas con sangre y tetraciclina (AS) ($4.5 - 5.0 \times 10^3$ UFC/ml). En total se obtuvieron 35 tipos de colonias aisladas, de las cuales fueron seleccionadas 17 para su identificación molecular luego de la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica. De las 35 colonias el 80% fueron bacterias Gram negativas y el 20% gram positivas. En la Tabla 1 se detalla la identificación molecular de los 17 aislados bacterianos.

Discusión.

Se identificaron bacterias de los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Phytobacter* y *Microbacterium* asociados a ovarios de *Aedes aegypti*. Algunas especies de los géneros *Pantoea*, *Serratia* y *Klebsiella* se han identificado como endosimbiontes, tienen alto poder entomopatógeno, y

amplio potencial biotecnológico por su producción de metabolitos secundarios (Vivero et al., 2016, Moraes et al., 2008). Se ha demostrado que son capaces de inhibir parásitos como *Leshmania* y *Plasmodium* (Bando et al., 2013), pero faltan estudios que demuestren su actividad contra arbovirus.

Estos resultados revelan que la carga bacteriana se redujo en el grupo tratamiento de alimentación sanguínea a diferencia de los grupos restantes. Esto se debe al ambiente oxidativo que se desarrolla en los órganos para digerir la sangre y vuelve específica la riqueza bacteria (Gusmão et al., 2010).

Conclusiones.

Este trabajo provee información básica sobre la riqueza de la microbiota asociada a diferentes condiciones de alimentación de *Aedes aegypti*. *Serratia marcescens* fue la especie bacteriana más frecuente en los ovarios de *Aedes aegypti*. Se generó una bacterioteca para la exploración de metabolitos secundarios y evaluación de uso potencial en el control biológico de insectos vectores o de los patógenos que transmiten.

Tabla 1. Similitud de secuencias del gen 16S rRNA de aislados bacterianos de ovarios de *Aedes aegypti*, con secuencias reportadas en GenBank.
 Nota: SA: Alimentación solución azucarada; AS: Alimentación sanguínea; AA: Alimentación sanguínea + antibiótico

Código del aislado	Taxa relacionado_Código GenBank	Phylum	Porcentaje de similitud BlastN (%)	Reporte en insectos	Tratamiento
Isolate 1	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC NR_114043.1	Proteobacteria	99.65	Col. Scarabaeidae (Kwak, Kyuwon et al. 2014; Bidari et al. 2018) <i>Anopheles stephensi</i> (Chen et al. 2017)	AA001
Isolate 2	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC NR_114043.1	Proteobacteria	99.85	Col. Scarabaeidae (Kwak, Kyuwon et al. 2014; Bidari et al. 2018) <i>Anopheles stephensi</i> (Chen et al. 2017)	AA002
Isolate 3	<i>Klebsiella grimontii</i> strain SB73 NR_159317.1	Proteobacteria	99.50	S/R	AA003
Isolate 4	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain NBRC NR_114226.1	Proteobacteria	98.78	S/R	SA001
Isolate 5	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain JCM NR_112010.1	Proteobacteria	94.67	Medfly (Diptera: Tephritidae) (Kyritsis et al. 2017) <i>Bactrocera minax</i> (Wang et al. 2014)	AA004
Isolate 6	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRCNR_114043.1	Proteobacteria	99.65	Col. Scarabaeidae (Kwak, Kyuwon et al. 2014; Bidari et al. 2018) <i>Anopheles stephensi</i> (Chen et al. 2017)	AS001
Isolate 7	<i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9 NR_025635.1	Proteobacteria	99.64	Cotton insect boll vector <i>N. viridula</i> (Medrano et al. 2014)	SA002
Isolate 8	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 NR_102854.1	Proteobacteria	95.57	<i>Drosophila</i> (entomopatógena) (Vodovar et al. 2006)	SA003
Isolate 9	<i>Pantoea dispersa</i> strain LMG NR_116755.1	Proteobacteria	99.85	<i>Culex quiquefasciatus</i> (Chandel et al. 2013)	SA004
Isolate 10	<i>Acinetobacter septicus</i> strain AK001 NR_116069.1	Proteobacteria	99.50	<i>Anopheles coluzzii</i> (Tchioffo et al. 2013)	AS002
Isolate 11	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> strain LS NR_115869.1	Proteobacteria	98.68	S/R	SA005
Isolate 12	<i>Microbacterium</i> sp NR_041560.1	Actinobacteria	85.45	S/R	AS003
Isolate 13	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC NR_114043.1	Proteobacteria	99.79	Col. Scarabaeidae (Kwak, Kyuwon et al. 2014; Bidari et al. 2018) <i>Anopheles stephensi</i> (Chen et al. 2017)	AS004
Isolate 14	<i>Microbacterium flavescens</i> strain IFO NR_112001.1	Actinobacteria	97.85	S/R	AS005
Isolate 15	<i>Klebsiella grimontii</i> strain SB73	Proteobacteria	99.50	S/R	AA005

	NR_159317.1				
Isolate 16	Serratia marcescens strain NBRC NR_114043.1	Proteobacteria	99.72	Col. Scarabaeidae (Kwak, Kyuwon et al. 2014; Bidari et al. 2018) Anopheles stephensi (Chen et al. 2017)	AA006
Isolate 17	Klebsiella variicola strain F2R9 NR_025635.1	Proteobacteria	99.57	Cotton insect boll vector N. viridula (Medrano et al. 2014)	SA006

Referencias.

- Bando, H. Okado, K., Guelbeogo, W.M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Xuan, X., Sagnon, N., & Kanuka, H. (2013). Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Scientific Reports*, 3, 1641. <http://dx.doi.org/10.1038/srep01641>.
- Charan, S.S., Pawar, K.D., Gavhale, S.D., Tikhe, C.V., Charan, N.S., Angel, B., Joshi, V., Patole, M.S., & Shouche, Y.S. (2016). Comparative analysis of midgut bacterial communities in three aedine mosquito species from dengue-endemic and non-endemic areas of Rajasthan, India: Midgut bacteria in *Aedes* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 30(3), 264–277. doi:10.1111/mve.12173.
- Gaio, A. de O., Gusmão, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Pimenta, P.F., & Lemos, F.J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & Vectors*, 4(1), 105. doi:10.1186/1756-3305-4-105.
- Gonzales, K.K., Tsujimoto, H., & Hansen, I.A. (2015). Blood serum and BSA, but neither red blood cells nor hemoglobin can support vitellogenesis and egg production in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PeerJ*, 3, e938. doi:10.7717/peerj.938.
- Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Bacci, M., Berbert-Molina, M.A., & Lemos, F.J.A. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Tropical*, 115(3), 275–281. doi:10.1016/j.actatropica.2010.04.011.
- Rey, J.R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35, 177-85. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>.
- Vivero Gómez, R.J., Cadavid Restrepo, G.E., Moreno Herrera, C.X., Ospina, V., Uribe, S.I., & Robledo, S.M. (2016). Antagonistic effect of bacteria isolated from the digestive tract of *Lutzomyia evansi* against Promastigotes of

Leishmania infantum, Antimicrobial activities and susceptibility to antibiotics. *Advances in Microbiology*, 6, 760-775.

Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G.B.K.S., & Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & Vectors*, 8(1). Tomado de <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/641>. doi:10.1186/s13071-015-1252-0.

Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar: Bacterial communities of wild *Aedes* mosquito vectors. *FEMS Microbiology Ecology*. 75(3), 377–389. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x.