



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

Caracterización Bacteriana del Tracto Digestivo de *Meccus
pallidipennis*

Tesis que para obtener el título de
Licenciado en Ciencias Biológicas

Presenta

Erick Fernando Cabrera Méndez

Director

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Co- director

Mtro. Axel Sampayo Andrade

Octubre, 2023

Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Antecedentes.....	7
4. Marco teórico.....	9
4.1 Triatomíneos.....	9
4.2 Microbiota intestinal.....	10
4.3 Métodos de identificación de microbiotas.....	11
5. Justificación.....	12
6. Objetivos.....	12
6.1 General	12
6.2 Particulares.....	12
7. Material y métodos.....	12
7.1 Preparación de medios.....	13
7.2 Extracción del tracto digestivo.....	13
7.3 Aislamiento bacteriano.....	14
7.4 Purificación de colonias y caracterización morfológica.....	14
7.5 Identificación bacteriana.....	16
7.5.1 Tinción de Gram.....	16
7.5.2 Prueba de Oxidación-Fermentación.....	17
7.5.3 Prueba de Movilidad Indol Ornitina.....	17
7.5.4 Prueba de Nitratos.....	17
7.5.5 Prueba de Catalasa.....	18
7.5.6 Prueba de Oxidasa.....	18
7.5.7 Claves diagnósticas.....	19
8. Resultados y discusión.....	23
9. Conclusiones.....	28
10. Perspectivas.....	28
11. Bibliografía.....	28

1. Resumen

Los Triatomíneos son un grupo de insectos de la familia Reduviidae, cobran importancia sanitaria debido a que son transmisores del agente causal de la enfermedad de Chagas *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). En México existen más de 34 especies de triatomíneos hematófagos estrictos capaces de transmitir el parásito. *Meccus pallidipennis* (antes *Triatoma pallidipennis*, Stål, 1872) es una de las especies más importantes al ser vinculado con el 74% de los casos de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en México. Parte del ciclo biológico del parásito *T. cruzi* se lleva a cabo dentro del tracto digestivo del insecto en donde bacterias, arqueas, hongos y protistas aportan metabolitos importantes para la digestión y su desarrollo, este conjunto de diversidad de organismos es conocido como microbiota. La exploración de la diversidad de la microbiota del tracto digestivo de triatomíneos abre la posibilidad de encontrar claves estratégicas de control biológico. En vista de lo expuesto, el objetivo central de este estudio consistió en la caracterización de las bacterias intestinales recuperables del vector. Para lograr esto, se emplearon técnicas de aislamiento, purificación y pruebas bioquímicas que permitieron identificar con éxito los géneros *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Paraburkholderia*, *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Marinococcus*, *Sacharococcus* y *Bacillus* en la muestra analizada. Los resultados obtenidos sientan las bases para investigaciones posteriores, donde se someterán estas bacterias a pruebas adicionales. El objetivo de estas futuras investigaciones será determinar si alguna de estas bacterias posee la capacidad de influir en el establecimiento de *T. cruzi*. Esto es particularmente relevante, ya que investigaciones previas con distintas especies de chinches han revelado bacterias con la capacidad de modular la colonización del parásito. El propósito final de esta línea de investigación es identificar una bacteria prometedora que pueda ser utilizada para influir positivamente en el establecimiento del parásito, con la perspectiva de reintroducirla en las poblaciones de *M. pallidipennis*. Con esto, se busca

contribuir a la prevención de la propagación del parásito *T. cruzi*, lo que representa un avance significativo en la lucha contra esta enfermedad.

2. Introducción

El término microbiota se refiere a la diversidad de microorganismos, como las bacterias, hongos, arqueas, virus y protozoos, que colonizan la superficie externa o interna de un organismo hospedero (Sekirov *et. al* 2010). Las interacciones que se establecen entre la microbiota y su hospedero, pueden ser de tipo mutualista, comensalista y parasítica. La microbiota de un organismo contribuye a las funciones metabólicas, protegen contra los agentes patógenos, preparan al sistema inmunitario y, a través de estas funciones básicas, afectan de manera directa o indirecta a la mayoría de sus funciones fisiológicas (Shreiner *et al.*, 2015). Esta relación mutuamente beneficiosa entre el hospedador y su microbiota residente tiene como resultado la producción de metabolitos por parte de los microorganismos que contribuyen a la aptitud evolutiva del hospedador. La diversidad y composición de la microbiota intestinal dentro de una misma especie de hospedador se ve influida por la variación topográfica y temporal de las comunidades microbianas, ya que determinadas especies bacterianas ocupan nichos específicos en el hábitat corporal o se asocian a determinadas fases de crecimiento o maduración del hospedador (Nicholson *et al.*, 2012).

Los estudios de la composición microbiana se han enfocado principalmente en los tipos de interacciones, inmunidad y metabolismo del hospedero (Engel & Moran, 2013). En insectos vectores se ha señalado la influencia de elementos de la microbiota sobre la eficiencia de transmisión del parásito (Ricci *et.al*, 2012) y el tiempo de desarrollo del hospedero (Chouaia *et al.*, 2012). Además, estos microorganismos ayudan al insecto hospedador a evitar la invasión de depredadores, parásitos y patógenos, y afectan directa o indirectamente a la fisiología y la salud de los insectos. Los microorganismos intestinales pueden

regular el apetito del hospedador influyendo en su sistema nervioso central (Li *et al.*, 2023).

El estudio de la microbiota intestinal en insectos vectores como los triatominos es primordial en parasitología porque muchas especies parasitarias habitan en el intestino del vector. Aunque los conocimientos sobre microbioma intestinal de varios vectores del flagelado parasitario *Trypanosoma cruzi* han aumentado (López-Ordoñez *et al.*, 2018; Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2020), los esfuerzos de investigación se han centrado en los triatominos sudamericanos (Jiménez-Cortés *et al.*, 2021). Estos insectos albergan una diversa gama de microbios simbióticos, algunos de los cuales favorecen el crecimiento y desarrollo del huésped, mientras que otros pueden resultar perjudiciales para los patógenos transmitidos por el vector (Sonenshine, D. E., & Stewart, P. E., 2021).

La chinche besucona (*Meccus pallidipennis*) pertenece a la familia de los Triatominos, un grupo de insectos hematófagos que actúan como vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, con una amplia distribución en las zonas este, oeste y centro de México (Martínez-Ibarra *et al.*, 2012). *M. pallidipennis* y otros Triatominos, han desarrollado adaptaciones especializadas para la ingesta de sangre.

Su evolución podría estar relacionada tanto con su asociación histórica con vertebrados como con adaptaciones previas para perforar y alimentarse de otras fuentes.

Se han propuesto dos hipótesis sobre el origen de los insectos hematófagos. La primera sugiere que estos surgieron a partir de linajes que vivían en estrecha asociación con vertebrados, alimentándose de piel, pelo o plumas; a lo largo del tiempo, algunos de estos insectos desarrollaron aparatos bucales especializados que les permitieron alimentarse directamente de los hospederos, y gradualmente evolucionaron hacia la alimentación de sangre (Lehane, 2005). La segunda hipótesis plantea que ya existían insectos con adaptaciones morfológicas previas para perforar, alimentándose de otros insectos o plantas. Con el tiempo, esta capacidad de perforación evolucionó para incluir la alimentación de sangre

(Lehane, 2005). La sangre, al ser una fuente de nutrientes más rica que la piel, pelo o plumas, fue aprovechada progresivamente por aquellos insectos que tenían adaptaciones más eficientes en sus piezas bucales. La sangre carece de algunos metabolitos esenciales tales como tiamina, piridoxina, folato y diferentes tipos de vitamina B (Rio 2016) que son requeridos para el metabolismo de los insectos hematófagos, y en su lugar estos insectos deben depender de su microbiota para compensar estos metabolitos faltantes.

Como se mencionó al inicio, *M. pallidipennis* es un vector del agente causal de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, y representa una interacción en su desarrollo como endoparásito obligado dentro de individuos de las especies de triatomíneos. Esto implica que *T. cruzi* forma parte de la diversidad microbiana en los individuos infectados. Cuando infectan el intestino de los triatomíneos, los tripanosomas comparten el mismo entorno con la microbiota bacteriana y fúngica de estos, y las interacciones entre ellos pueden ser decisivas tanto para los parásitos como para las bacterias. Uno de los principales inconvenientes para entender la dinámica de los tripanosomas en el campo es la falta de conocimientos sobre las interacciones entre los tripanosomas, sus insectos vectores y la microbiota que vive en el tracto intestinal del insecto (Guarneri & Schaub, 2021).

T. cruzi complementa parcialmente su ciclo biológico en el insecto (Figura 1), el triatomíneo consume sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes, una vez en el estómago ocurre la transformación de los tripomastigotes en epimastigotes y en algunos casos en esferomastigotes. Los epimastigotes se dividen por fisión binaria y se adhieren temporalmente a la membrana perimicrovellosa, al soltarse los epimastigotes migran al recto, donde nuevamente se adhieren durante un tiempo y al soltarse del epitelio rectal ya como tripomastigotes metacíclicos son expulsados a través de las heces.

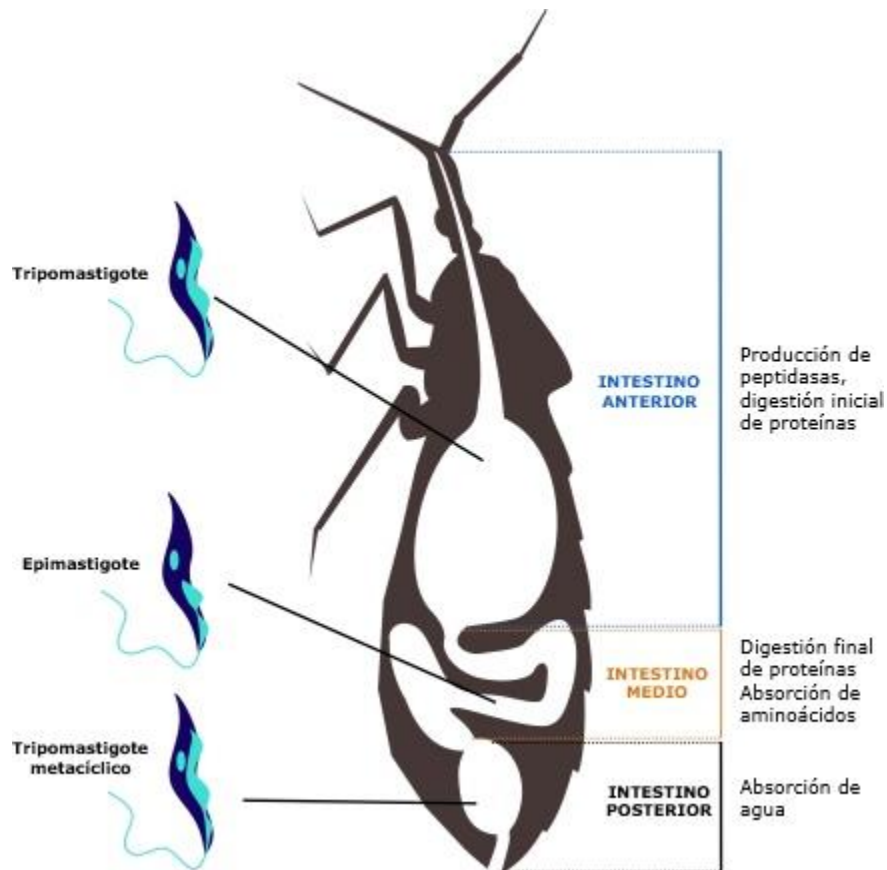


Figura 1. Sectores generales del tubo digestivo de un triatmino, eventos digestivos y formas localizadas del ciclo biológico de *T. cruzi* (Modificado de Peña-Callejas *et al.*, 2022)

3. Antecedentes

Se han llevado a cabo múltiples estudios sobre insectos vectores enfocados en la investigación de su microbiota bacteriana intestinal. Estos microorganismos pueden tener una influencia significativa en la competencia de los vectores, ya sea a través de interacciones directas con el parásito o mediante la competencia por recursos en el intestino (Sant'Anna *et al.*, 2012). Además, pueden inducir indirectamente la actividad antiparasitaria del vector y fortalecer los factores de defensa inmunitaria. Por esta razón, varios estudios se han centrado en la caracterización de la microbiota bacteriana en insectos vectores, como el estudio realizado por Díaz *et al.* (2016). En este trabajo se examinaron cambios en la composición bacteriana de los triatominos en respuesta a la exposición a sangre infectada con el parásito e identificar los factores clave que determinan esos

cambios; Para esto se caracterizó la microbiota bacteriana de seis especies de triatomíneos, a saber, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* y *T. sherlocki*. El autor menciona que utilizó la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA bacteriano en la región V3-V4, donde se identificaron diversas bacterias pertenecientes a los géneros *Arsenophonus*, *Staphylococcus*, *Pectobacterium*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Morganella*, *Dechloromonas*, *Clostridium* y *Corynebacterium*.

Por otro lado, otros estudios se enfocaron en la composición de la microbiota bacteriana en el vector en diversos estados fisiológicos, en *Lutzomyia intermedia*, un vector crucial en la transmisión del parásito *Leishmania* (Monteiro *et. al.* 2016). Mediante la secuenciación metagenómica (HiSeq X Illumina), se identificó la diversidad de bacterias pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Pelomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Kluyvera*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Kingella*, *Curtobacterium*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rickettsia* y *Wolbachia*.

En otro estudio con similares características a los anteriores, Boissière *et al.*, 2012 caracterizaron la microbiota presente en el intestino medio del vector mediante la secuenciación de ADNr según el estado de infección en el que se encuentre. La microbiota descrita se sitúa en 26 diferentes phylum, entre los que se encuentran cinco en particular con poco más del 99% del total de microbiota: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Fusobacteria*.

En años más recientes, (López *et. al.* 2018), llevaron a cabo la caracterización de la microbiota bacteriana cultivable del intestino medio posterior de *T. dimidiata*. Para caracterizar a las bacterias cultivables se utilizó la técnica de amplificación de la subunidad 16S ribosomal. Las bacterias encontradas pertenecen a 5 géneros: *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* & *Delftia*.

De igual manera en 2018 Montoya evaluó la composición bacteriana intestinal de poblaciones naturales de triatomíneos mediante la secuenciación de la región V4 de RNAr (MiSeq de Illumina). Los resultados mostraron 13 géneros bacterianos

predominantes en ambas especies, comenzando por *Burkholderia*, *Gordonia*, y *Ralstonia*, que son los géneros bacterianos con mayor prevalencia. Además, géneros representativos de cada especie fueron encontrados como *Williamsia* y *Kocuria* fueron los más comunes en *R. pallescens*; y *Dietzia*, *Aeromonas* y *Pelomonas* fueron observados únicamente en *T. maculata*.

4. Marco teórico

4.1 Triatominos

La subfamilia Triatominae incluye cerca de 150 especies clasificadas en seis tribus y 19 géneros (García *et al.*, 2022).

Los Triatominos *Meccus pallidipennis* se distribuye en 9 estados en el Oeste, centro y Sur de México, (Salazar Schettino *et al.* 2010, Martínez Iba Benítez Alva *et al.* 2012)

Los triatomas en general presentan cinco estadios ninfales antes de entrar en la fase adulta, que es cuando alcanzan la madurez sexual (Franzini-Junior 2018)

Los miembros de la subfamilia Triatominae son identificados por una conexión membranosa de tejido conjuntivo, exclusiva del grupo que une el tercer y segundo segmento de la proboscis (Figura 2). La flexibilidad de esta estructura facilita la inserción de la proboscis en el hospedero.



Figura 2. Cabeza y proboscis de un triatomino (2019)

4.2 Microbiota intestinal

La fuente de alimentación de un insecto hematófago implica un bajo balance de nutrientes (Sassera *et al.* 2013). Las bacterias mutualistas son adquiridas a través de la coprofagia y también al inhalar aire durante la ecdisis (Beard *et al.*, 2002; Balczun *et al.*, 2008; Sassera *et al.*, 2013)

La microbiota intestinal de los triatominos está compuesta principalmente de bacterias que se multiplican rápidamente después de la ingesta de sangre (Azambuja *et al.* 2004; Flores *et al.* 2015). Las bacterias metabolizan los compuestos del alimento y vuelven disponibles nutrientes esenciales como la vitamina B o en procesos digestivos (Beard *et al.*, 2002; Sassera *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2015).

Las especies de triatominos y de todo el suborden Heteróptera, establecen interacciones simbióticas extracelulares y al parecer, han perdido cualquier asociación primaria y en su lugar se asociaron con simbioses extracelulares (Gordon *et al.* 2016).

Se ha demostrado que las comunidades bacterianas pueden interferir con la invasión de parásitos, por otro lado, algunas cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* son capaces de modular la microbiota (Vieira *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 2018)

La microbiota presente en el tracto digestivo de insectos vectores, tiene la capacidad de modular la competencia del vector, la cual es la capacidad de adquirir, mantener y transmitir patógenos (Díaz *et al.*, 2016; Ruiz 2019). Muchos factores han sido implicados en el establecimiento de *T. cruzi* en el intestino del insecto vector, incluyendo un factor lítico de cultivo, lectinas, enzimas intestinales, y factores derivados de la microbiota, compuestos antimicrobianos y óxido nítrico (Castrlanger *et al.* 2006; Castro *et al.* 2012)

Los efectos que tiene la microbiota de triatominos sobre *T. cruzi* y los efectos de *T. cruzi* sobre la microbiota de los triatominos pueden ser conceptualmente separados. Los efectos de la microbiota sobre *T. cruzi* son especialmente evidenciados por *Serratia marcescens* una especie de bacteria encontrada en triatominos del campo (Da Mota *et al.* 2012, 2019; Guarneri, A., y Lorenzo, M 2021) capaz de lisar a la forma de epimastigote del parásito a través de la D-manosa que reconoce las fimbrias de las bacterias adheridas a la superficie del tripanosoma (Azambuja *et al.* 2004; Guarneri, A., & Lorenzo, M 2021). Un simbionte mutualista transformado genéticamente, la bacteria *Rhodococcus rhodni* de *R. prolixus* es capaz de inhibir el desarrollo del parásito produciendo un péptido antibacteriano de un lepidóptero y un simbionte de *Triatoma infestans*, *Corinebacterium* produciendo fragmentos de un anticuerpo (Guarneri, A., & Lorenzo, M 2021).

La interacción entre las bacterias simbiotes y *T. cruzi* también puede ocurrir a través de la competencia por recursos o la inducción de la respuesta inmune humoral del triatomino ya sea por el parásito o las bacterias (Azambuja *et al.* 2005a; Guarneri, A., & Lorenzo, M 2021).

4.3 Métodos de identificación de microbiotas

La investigación de microbiota en triatominos se puede diferenciar mediante dos metodologías: la de cultivo dependiente y la independiente que es la que utiliza técnicas moleculares. La primera consta en sembrar el contenido intestinal diluido

en placas de agar seguido de la clasificación de las colonias bacterianas de acuerdo con características macro y microscópicas, tinción de gram y reacciones bioquímicas (oxidasa, catalasa, oxidación/fermentación) y sistema Api. La segunda que consta de técnicas moleculares utiliza la técnica de secuenciación 16S ribosomal y DNA (Schaub 2020).

5. Justificación

Aislar y caracterizar las cepas bacterianas de los intestinos de los triatomíneos no sólo permite conocer la composición de las comunidades bacterianas de uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en México, sino también aportar antecedentes para identificar posibles dianas bacterianas para la paratransmisión, o cepas bacterianas que interfieran en el establecimiento de *T. cruzi* en los triatomíneos mediante la producción de metabolitos secundarios, la modulación del sistema inmunitario del insecto o una actividad tripanolítica directa.

6. Objetivos

6.1 General

Determinar las bacterias cultivables de la microbiota intestinal en ejemplares adultos de cría masiva controlada de *Meccus pallidipennis*

6.2 Particulares

1. Extraer el tubo digestivo de ejemplares de *Meccus pallidipennis*
2. Cultivar colonias bacterianas a partir del contenido digestivo
3. Caracterizar la macro y micromorfología de las colonias.
4. Identificar la diversidad bacteriana mediante pruebas bioquímicas

7. Material y Métodos

Para el desarrollo de la fase experimental de esta investigación, se utilizaron 10 miembros de la colonia de *M. pallidipennis* procedentes del Laboratorio de

Parasitología y Vectores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los insectos son mantenidos hasta la fecha en condiciones controladas a una temperatura de 26 ~ 29 °C y una humedad relativa del 65 ~ 80% con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Los ejemplares de origen de las muestras fueron alimentados con ingestas masivas de sangre de conejo cada 15 días en lapsos de 30 minutos.

7.1 Preparación de medios

Para la preparación de medios se utilizaron tres tipos de agar nutritivo: base agar sangre (pH 7.3 ±0.2), extracto de levadura, cloruro de sodio y agar bacteriológico, agar BHI (Brain heart infusion) y agar brewer. La fórmula para preparar agar sangre es 40g/l con, agregando 5% de sangre humana al volumen total. El agar BHI está preparado con infusión de cerebro y corazón de ternera, hidrolizado péptico de tejidos animales, hidrolizado pancreático de caseína, cloruro sódico, glucosa, fosfato disódico y agar, para su preparación se utiliza 37g/l pH 7.4+/- 0.2.

Para el agar Brewer la fórmula es peptona de caseína, extracto de levadura, dextrosa, cloruro de sodio, tioglicolato de sodio y L-cistina, para su preparación se necesita 51g/l con pH final de 7.1 ± 0.2.

Una vez preparados, se esterilizaron en autoclave (marca) durante 15 minutos a 121°C.

7.2 Extracción del Tracto Digestivo

Para obtener el tracto digestivo, cada triatoma fue inmovilizado y desensibilizado por enfriamiento a 4°C durante 20 minutos (Vitta *et. al.* 2009). Se procedió a la desinfección superficial del ejemplar mediante la inmersión en alcohol etílico absoluto durante 5 segundos, enjuague en agua destilada estéril durante 30

segundos (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Después el ejemplar fue puesto en una caja petri en solución Ringer a 4°C para mantener el equilibrio osmótico celular. El tracto digestivo fue expuesto cortando el tejido conexivo alrededor del abdomen, para posteriormente separar la placa dorsal y ventral. Una vez obtenido el tracto digestivo, se enjuagó en agua destilada estéril para eliminar restos de tejido graso sobrante, luego se colocó en un tubo estéril de 5ml con caldo BHI con agitación en Vórtex durante 30 segundos (Da Mota *et al.*, 2012).

7.3 Aislamiento Bacteriano

Las soluciones de tejido intestinal previamente agitadas en vórtex fueron utilizados como solución cero, y a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en factor 1:10 V/V para reducir la densidad bacteriana 10^{-1} a 10^{-8} (Jiménez *et al.*, 2021;), inoculando 100 μ L en placas Petri que contenían medio agar sangre. Las placas se incubaron a 30°C y se observaron a las 24, 48 y 72 h. Posteriormente, se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se clasificaron por morfología.

Para obtener bacterias anaerobias, se utilizó la técnica de vertido en placa sobre agar bewers. Se tomó 1 ml de cada dilución bacteriana y se agregó sobre una capa de agar con el inóculo. Luego, se extendió el líquido mediante movimientos circulares durante 8 segundos. A continuación, se aplicó otra capa de agar sobre la primera capa ya gelificada (Thatcher & Clarck, 1973). Las placas se incubaron durante 24 y 48 horas para favorecer un crecimiento adecuado y se realizaron observaciones.

7.4 Purificación de colonias y caracterización morfológica

De las placas con diluciones seriadas que presentaron crecimiento, se aislaron las colonias más representativas y separadas de la masa celular en donde se encontraban aglomeradas la mayoría de las colonias para posteriormente, evaluar su morfología en cultivos puros. La identificación bacteriana y la caracterización

completa solo es posible tras el aislamiento de la colonia y la obtención de cultivos puros. Una vez que se realizó el aislamiento es posible obtener la bacteria de interés en cultivo puro. El método utilizado fue la siembra por estriado sobre agar BHI (Infusión cerebro-corazón) tomando una mínima porción de la colonia con un asa bacteriológica para estriarla en la placa, sobre el medio quedan separadas e inmovilizadas las células bacterianas. Tras la incubación a 30°C, cada célula viable originó una colonia visible resultado de sucesivas divisiones celulares. La purificación se realizó por triplicado hasta que la colonia presentó un color homogéneo. Para determinar los morfotipos en placa, se utilizó un asa bacteriológica recta para transferir una porción de las diferentes colonias con la técnica de punteo en placa, se sembró en el centro de esta en agar BHI. Las placas se incubaron durante 24 horas, después de este tiempo, se llevó a cabo una revisión visual para confirmar el crecimiento de las colonias.

Posteriormente, se realizó la determinación de morfotipos bacterianos utilizando 32 marcadores morfológicos (Figura 3) que representan las variables de evaluación de las características macroscópicas, las cuales se transformaron en datos binarios de correspondencia y no correspondencia (0,1). Se efectuó un análisis multivariado con conglomerados para distinguir la distancia morfológica existente entre los organismos determinados mediante la representación gráfica de un dendograma con el programa PAST 4 Versión 4.13 (Hammer *et al.*, 2001; Moreno-Valencia *et al.*, 2018).

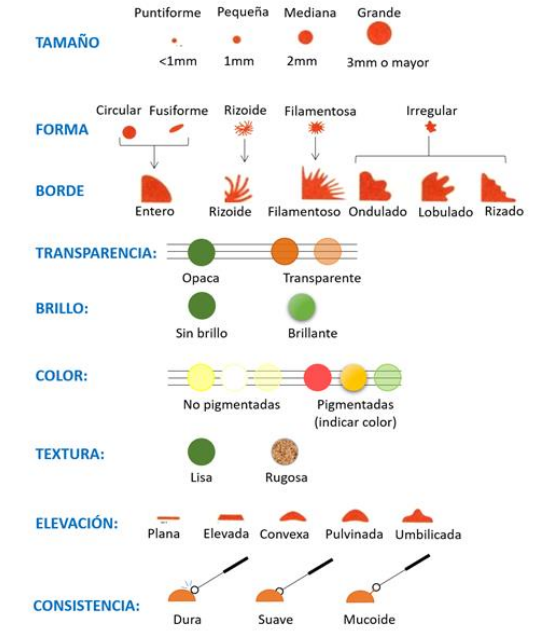


Figura 3. Criterios de diferenciación morfológica.

Morfología colonial. (2021).

7.5 Identificación bacteriana

7.5.1 Tinción de Gram

La aplicación de esta técnica se basa en la estructura de la pared celular bacteriana. Dependiendo del grosor de dicha pared, las bacterias se tiñen de azul violeta (gram positivas) o de safranina (gram negativas) (Rodríguez et al., 2011).

Para llevar a cabo la técnica de tinción de Gram, se emplean cuatro reactivos distintos. El primer reactivo es el colorante cristal violeta, el cual confiere a las células un tono azul violeta. El segundo reactivo es el Lugol, utilizado para fijar el colorante cristal violeta en la pared celular. Este proceso ocurre únicamente si la pared celular es gruesa, ya que, al añadir el tercer reactivo, una mezcla de alcohol y cetona, se produce la decoloración del colorante. En caso de que la pared celular sea delgada, el cristal violeta se disuelve. Finalmente, se aplica la safranina, un colorante que otorga a las bacterias gram negativas su característico tono rosa.

7.5.2 Prueba de Oxidación-Fermentación

Se determinó la capacidad de las bacterias aisladas de oxidar o fermentar un compuesto orgánico a través del medio de cultivo de oxidación-fermentación (OF). Esta prueba determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono producido por los microorganismos para la generación de energía en forma de ATP. Para esta prueba se preparó 100ml y se utilizaron 0.2gr de peptona, 0.5gr de cloruro de sodio, 1gr de D-glucosa, 0.003gr de azul de bromotimol, 0.3gr de agar, 0.03gr de fosfato dipotásico ajustando el pH a 7.1. Posteriormente todo se distribuyó en tubos de ensaye con 3ml cada uno, luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Rodríguez, P. A., y Arenas, R. 2018)

7.5.3. Prueba de Movilidad-Indol-Ornitina

Esta prueba es ampliamente utilizada para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos, sobre la base de la producción de Indol, la actividad de la enzima Ornitina decarboxilasa y la capacidad de motilidad. Para la preparación del medio, se pesaron 2.79g del medio deshidratado para 90ml. El polvo del medio se colocó en un matraz que contenía 90ml de agua destilada, se calentó hasta el punto de ebullición hasta completar la disolución. Posteriormente se distribuyó el líquido en tubos de cristal de 3ml y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Laboratorios Britania, S. A. 2015). MIO Medio.

7.5.4. Prueba de Nitratos

Para determinar la capacidad de respirar nitrato reduciéndolo a nitrito o a nitrógeno libre de las bacterias aisladas, se realizó la prueba de nitratos. La reducción de nitrato a nitrito y a gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo utiliza nitrato como aceptor de electrones. El nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo. Para esta prueba, se utilizó agar nutritivo con 1% de NO_3K distribuyendo de 3ml por tubo y con una incubación de 24hrs. La reducción de NO_3 a NO_2 se evidencia

por el agregado de reactivos A y B de Peter Griess. El reactivo A contiene Alfa-naftil amina (0,5 g) y Ácido acético 5N (100ml); el Reactivo B contiene ácido sulfanílico (0,8 g) y ácido acético 5N (100ml). La reacción final se divide en dos fases que determina la prueba positiva de nitratos: en la Fase 1, se agregó directamente al medio de cultivo con 1% de nitrato (previamente inoculado e incubado a 37°C) 1 ml de reactivo A y luego 1 ml de reactivo B. La reducción de NO_3 a NO_2 se evidenció por la aparición de color rojo intenso cuando el nitrito reacciona con el ácido sulfanílico y el alfa naftilamina formando el p-sulfo benceno-azo alfa naftil amina (sal diazónica). Si da resultado negativo se continúa con la siguiente fase. Fase 2: Método de reducción del zinc: se agregó directamente al tubo que contenía los reactivos A y B, una pizca de polvo de zinc (Rodríguez, 2011).

7.5.5. Prueba de la Catalasa

Se determinó la actividad de la presencia de la enzima catalasa de las bacterias aisladas por medio de este procedimiento cualitativo. La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos, a excepción de los estreptococos y enterococos. Para el procedimiento, se utilizó Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% como reactivo. En una placa que contenía la cepa bacteriana con crecimiento, se añadieron unas gotas de H_2O_2 al 3% en una zona donde se observaba bastante biomasa, la rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas (O_2) se considera una reacción positiva. Este burbujeo es consecuencia de la acción de la catalasa que al entrar en contacto con el peróxido de hidrógeno convierte a este compuesto en agua y oxígeno (Ramírez *et al.* 2022)

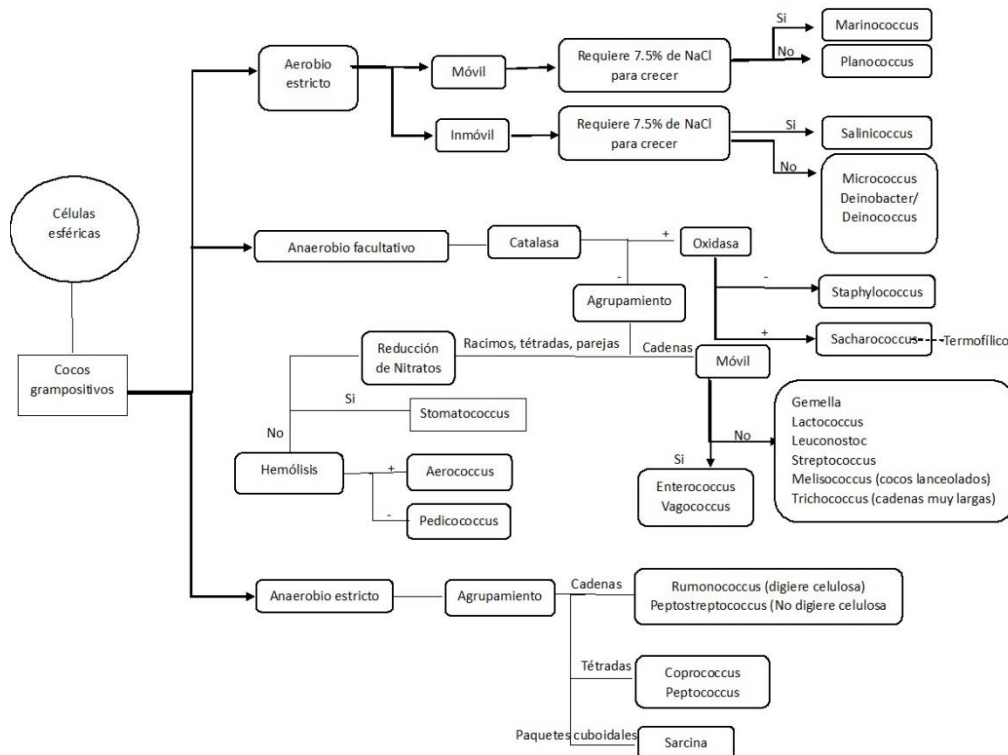
7.5.6. Prueba de la Oxidasa

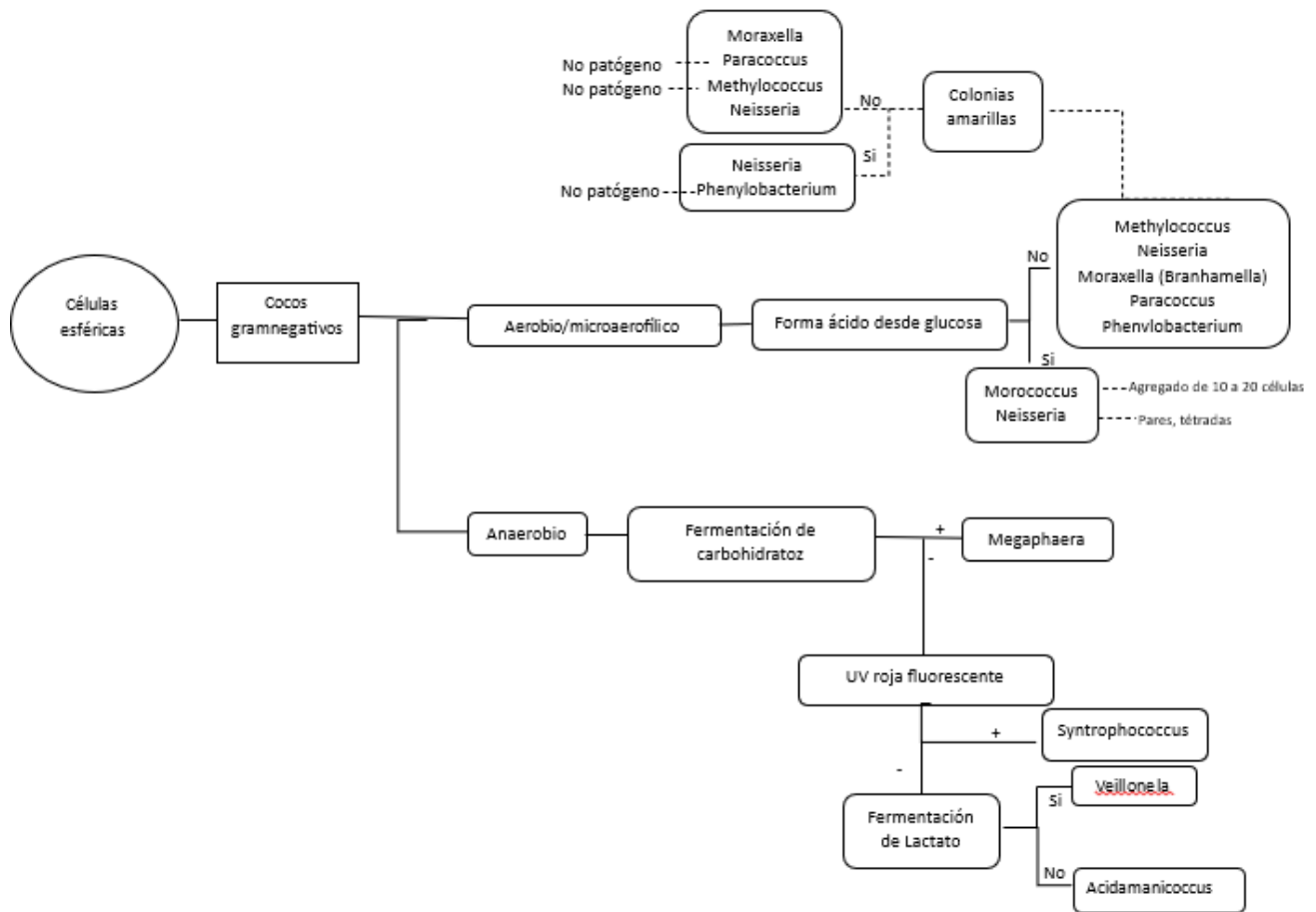
Esta prueba se realizó para determinar la presencia de un componente de la cadena respiratoria, la enzima citocromo oxidasa que reduce al oxígeno molecular, transfiriendo los electrones de las reducciones que se producen en las oxidaciones celulares. capaces de desarrollar en presencia de O_2 y de producir la enzima

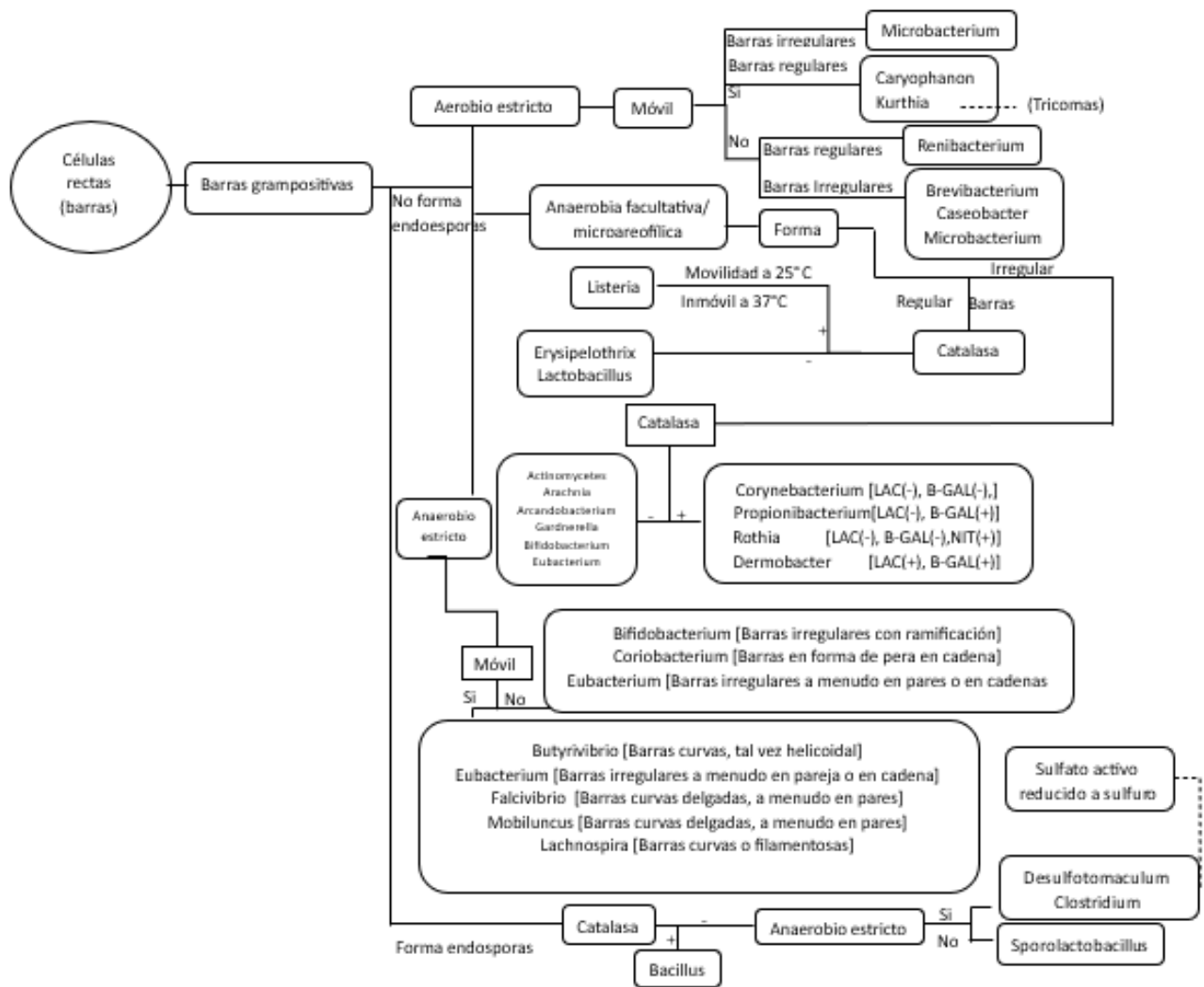
catalasa. Para realizar la prueba se debe colocar y extender sobre una tira o disco de papel de filtro impregnado con diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de oxidasa), una colonia del microorganismo en estudio y esperar de 30 a 60 segundos (Ramírez *et al.* 2022).

7.5.7. Claves diagnósticas.

La identificación se realizó de manera escalonada por medio de las claves dicotómicas. Se avanza a lo largo de rutas que se ramifican progresivamente, dependiendo de las respuestas positivas o negativas a las pruebas, un error en una prueba conduce al diagnóstico equivocado. Debe confirmarse con las tablas de reacciones que darán la certeza de la identificación de la cepa. La identificación bacteriana se llevó a cabo con ayuda de las siguientes guías Abis online (2023)







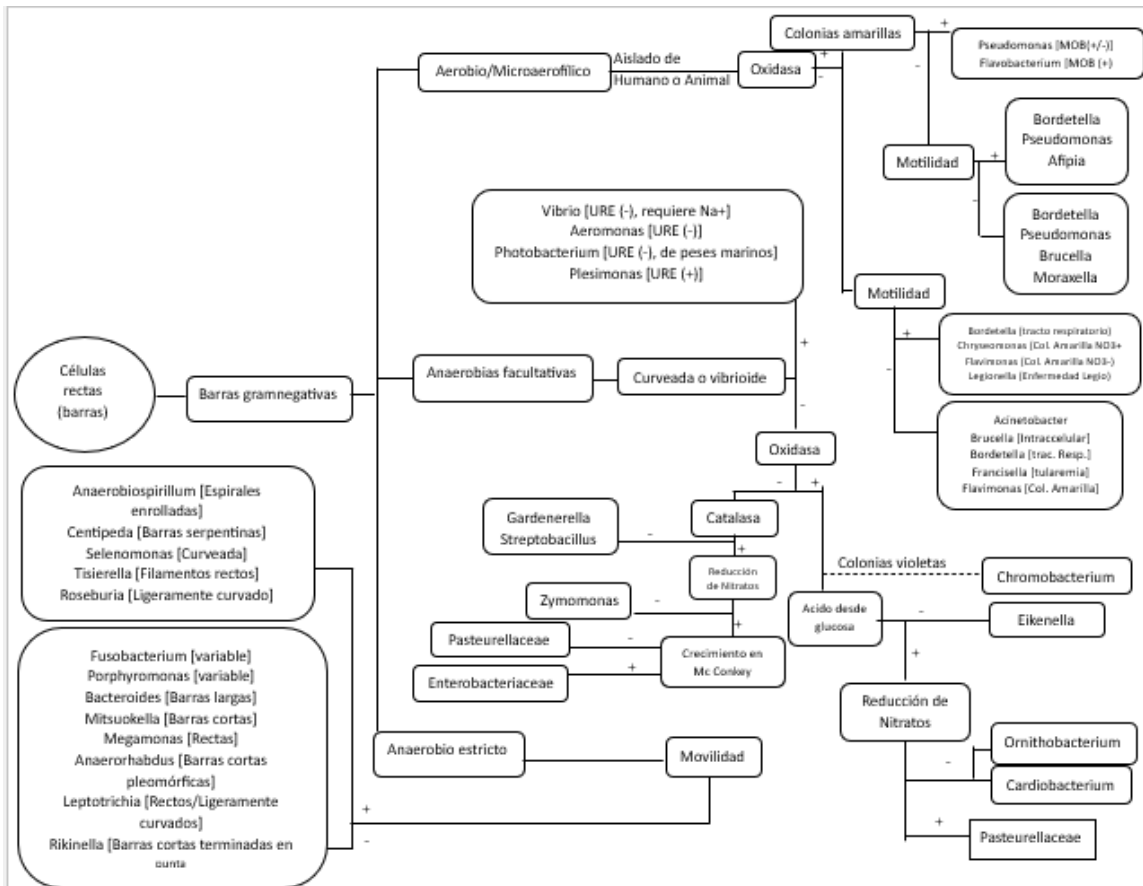


Figura 4. Claves dicotómicas para la identificación de cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de *M. pallidipennis*. A) Mapa de identificación bacteriana cocos grampositivos; B) Mapa de identificación bacteriana cocos gramnegativos; C) Mapa de identificación bacteriana cocos grampositivos; D) Mapa de identificación bacteriana bacilos gramnegativos.

8. Resultados y Discusión

Con el propósito de extirpar el sistema digestivo de *M. pallidipennis*, se llevó a cabo una disección siguiendo el método propuesto por (Da Mota et al., 2012). Utilizando pinzas de precisión, se procedió a retirar el tejido adiposo, obteniendo así el tubo digestivo.

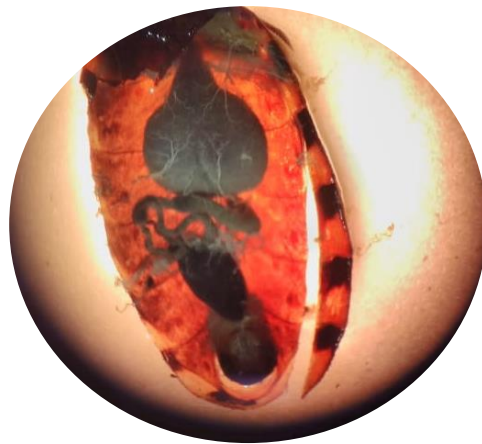


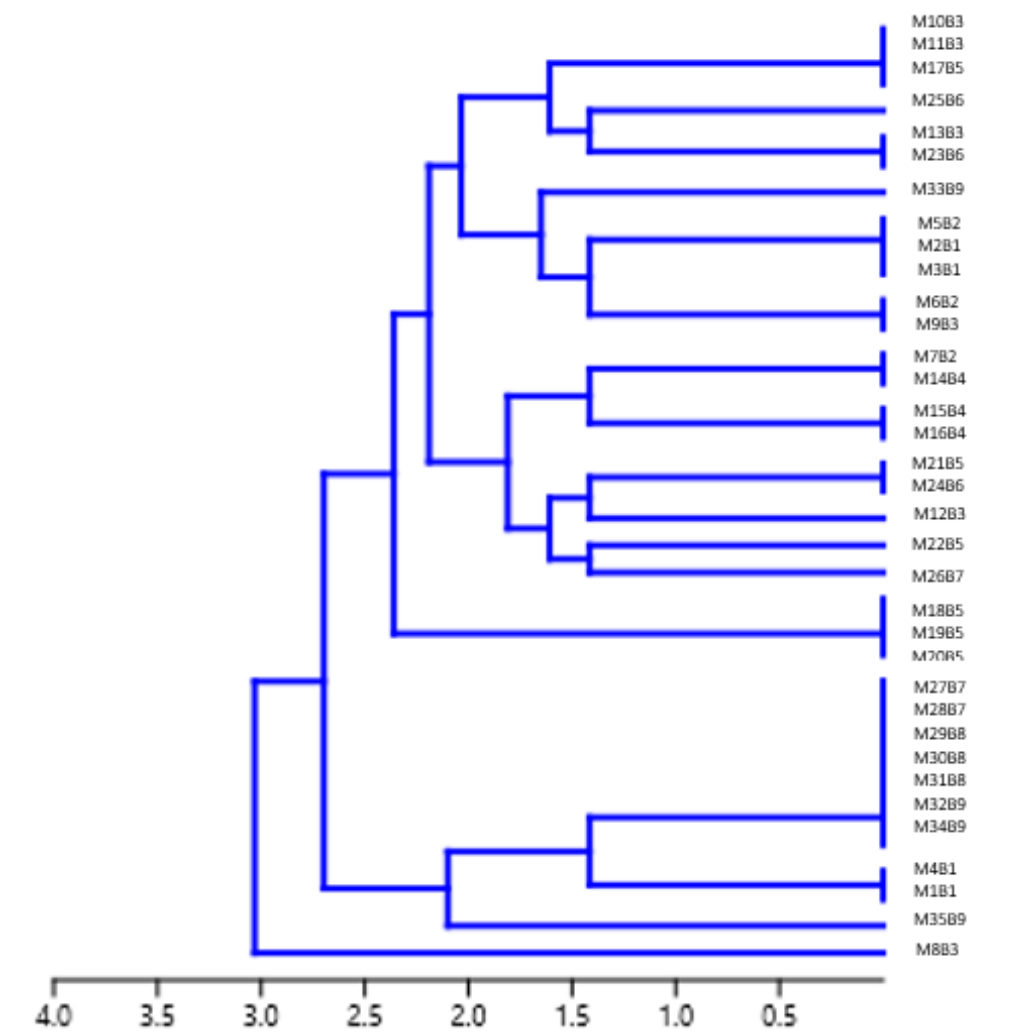
Figura 4. Tubo digestivo de *M. pallidipennis*

El contenido intestinal se diluyó con el objetivo de disminuir la concentración bacteriana. Posteriormente, se realizó el cultivo en placas de agar sangre y se incubaron a 30°C. Esto permitió el crecimiento de colonias presentes en el tejido. Las colonias que presentaron características distintivas fueron seleccionadas, aisladas y posteriormente purificadas para su estudio.



Figura 5. Colonias bacterianas aisladas del tubo digestivo de *M. pallidipennis*

Con la finalidad de aislar las bacterias asociadas al tracto digestivo, se realizaron cultivos microbianos del mismo como fuente de inóculo, se observó buen crecimiento a las 72 horas con temperatura de 26°C a 30°C, inicialmente en agar sangre, luego fueron resembradas en agar BHI para su purificación y determinación morfológica, con la determinación morfológica se realizó un dendograma (Figura 7). Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas para



determinar a qué género bacteriano pertenecían (Tabla 1).

Figura 6. Dendograma de morfología bacteriana, donde se señala la distancia morfológica que existe de las distintas colonias.

Para la caracterización micromorfológica, se tiñeron todas las cepas y posteriormente para identificar a las bacterias, se realizó un paquete de pruebas bioquímicas, basadas en las figuras 3, 4, 5 y 6 y se representan en la Tabla 1

Tabla 1. Identificación de cepas bacterianas según las Claves dicotómicas basadas en las pruebas bioquímicas aplicadas

Nombre de la cepa	Prueba Gram	Ae/Fac	O/F	OX	Cat	Mot	Nit	Glu	Lac	Gal	Género
M1B1	Cocos+	Fac	Nr	+	+	+	+	-	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M2B1	Cocos+	Ae	Nr	+	+	+	+	-	n/r	n/r	<i>Marinococcus</i>
M3B1	Cocos+	Ae	O	+	+	+	+	+	n/r	n/r	<i>Marinococcus</i>
M4B1	Cocos+	Ae	O	+	+	-	+	+	n/r	n/r	<i>Micrococcus</i>
M5B2	Cocos+	Fac	O	+	+	-	-	+	+	-	<i>Sacharococcus</i>
M6B2	Cocos+	Fac	F	+	+	-	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M8B3	Cocos+	Ae	Nr	+	+	+	-	-	+	nr	<i>Marinococcus</i>
M9B3	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M10B3	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M11B3	Cocos+	Fac	O	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M12B3	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	-	-	<i>Sacharococcus</i>
M13B3	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	-	-	<i>Sacharococcus</i>
M14B4	Cocos-	Fac	OF	+	+	+	-	+	-	-	<i>Neisseria</i>
M15B4	Cocos+	Ae	NR	+	+	-	+	-	-	-	<i>Micrococcus</i>
M16B4	Cocos+	Ae	NR	+	+	-	+	-	-	-	<i>Micrococcus</i>
M17B5	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	-	-	<i>Sacharococcus</i>

M18B5	Cocos+	Fac	F	-	-	-	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M19B5	Cocos+	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M20B5	Cocos-	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Neisseria</i>
M21B5	Cocos+	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M22B5	Cocos+	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M23B6	Cocos+	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M24B6	Cocos+	Fac	OF	-	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
M25B6	Bacilos+	Ae	O	+	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>
B26B7	Cocos+	Ae	NR	+	+	+	+	+	-	-	<i>Marinococcus</i>
M27B7	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M28B7	Cocos+	Ae	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Marinococcus</i>
M29B8	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	-	<i>Sacharococcus</i>
M30B8	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M31B8	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M32B9	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M33B9	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	-	-	<i>Sacharococcus</i>
M34B9	Cocos+	Fac	OF	+	+	-	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>
M35B9	Cocos+	Fac	OF	+	+	+	+	+	+	+	<i>Sacharococcus</i>

**Ae/Fac= Aerobios/Facultativos. O/F= Oxidación/ Fermentación. OX= Oxidasa
 Cat= Catalasa. Mot= Motilidad. Nit= Nitratos. Glu= Glucosa. Lac= Lactosa.
 Gal= Galactosa. += Positivo. - = Negativo.**

Diversos estudios han abordado la diversidad microbiana en el tracto digestivo de triatomíneos y han sugerido que, en general, presentan una diversidad microbiana más baja en comparación con otros grupos de insectos (Da Mota *et al.*, 2012; Gumiel *et al.*, 2015; López *et al.*, 2018).

En este estudio particular, se examinaron ejemplares adultos de *Meccus pallidipennis*, y se encontraron bacterias de diferentes géneros, como *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Paraburkholderia*, *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Marinococcus*, *Sacharococcus* y *Bacillus*.

Estos resultados difieren de los géneros bacterianos reportados por Joshimer (2011), quien mencionó los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsella* y *Salmonella*. Es de importancia saber que este estudio de Joshimer se realizó únicamente con ninfas del tercer estadio y con la especie *Panstrongylus geniculatus*. En otro estudio similar con *Triatoma barberi* realizado por De la Cruz (2013), se encontraron bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* y *Mycrococcus*. Algunos de estos géneros coinciden con los encontrados en el presente estudio, especialmente *Acinetobacter*.

Además, López *et al.* (2018) llevaron a cabo un estudio con *Triatoma dimidiata* y encontraron los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* y *Delftia* en su tracto digestivo.

En un estudio muy similar al presente, pero llevado a cabo utilizando la misma especie (*M. pallidipennis*) y abarcando tanto ninfas en el quinto estadio como ejemplares adultos, Jiménez (2021) informó principalmente la presencia de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*. Además, se identificaron otros géneros como *Escherichia coli*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Neisseria*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Salmonella* y *Acinetobacter*. Entre los hallazgos coincidentes se destacan los géneros *Neisseria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Acinetobacter*. Cabe resaltar que el estudio de Jiménez se basó en muestras recolectadas en ambientes naturales, lo que podría explicar las discrepancias en la composición de la microbiota bacteriana. Asimismo, en el caso de los ejemplares de laboratorio, solo se encontraron los géneros *Bacillus*, *Lactococcus* y *Staphylococcus*.

Otra diferencia con el trabajo de Jiménez es que se identificaron más colonias del género *Bacillus*, siendo el género más preponderante entre los aislados, mientras que en este trabajo se logró identificar una cepa. También se logró observar crecimiento de bacterias anaerobias estrictas y

aunque no se pudieron identificar debido a la dificultad que se presenta para mantenerlas, se sabe que se pueden hacer crecer e identificar con el material pertinente.

9. Conclusiones

Con la metodología empleada en este trabajo, se lograron recuperar e identificar un total de 10 géneros bacterianos provenientes del tracto digestivo de *M. pallidipennis*.

Con los medios de cultivo utilizados se lograron aislar cepas bacterianas provenientes del tracto digestivo de *Meccus pallidepnnis*

Se caracterizaron y agruparon 17 morfotipos bacterianos macro con base en los marcadores morfológicos descritos en este trabajo.

10. Perspectivas

Es necesario hacer pruebas moleculares a las bacterias encontradas para determinar a qué especie corresponde, además conocer si alguna pudiera modular el establecimiento de *T. cruzi*, así como identificar qué tipo de asociación tienen las bacterias presentes con el triatoma, es decir saber si son patógenos, comensales o mutualistas.

Es necesario identificar a las bacterias anaerobias estrictas, ya que al igual que las aerobias, pudieran interferir en el establecimiento del parásito.

11. Bibliografía

1. Arias, J. P. (2019). Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. *Revista Digital Universitaria*, 20(1).
2. Azambuja, P., Feder, D. & Garcia, E.S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*, 107, 89–96.
3. Azambuja, P., Garcia ES, Ratcliffe NA (2005a). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol*, 21: 568–572.
4. Beard, C.B., Cordon-Rosales, C. & Durvasula, R.V. (2002). Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology*, 47, 123–141.
5. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C (2006). Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol*, 22: 262–268.
6. Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., ... & Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002742.
7. Cabeza y proboscis de un triatomino. (2019). Modificado de https://www.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/t_sansisuga.html. Consultado el 10/07/2023).
8. Callejas, G. P., González, J., Cortés, J. G. J., Vicente, J. A. D. F., Schettino, P. M. S., Torres, M. I. B., ... & Villegas, A. L. F. (2022). Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1-19.
9. Castro, D. P., Moraes, C. S., Gonzalez, M. S., Ratcliffe, N. A., Azambuja, P., & Garcia, E. S. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One*, 7(5), e36591.
10. Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. (2022). *Nova*, 20(39), 121-150.
11. Chouaia, B., Rossi, P., Epis, S., Mosca, M., Ricci, I., Damiani, C., ... & Favia, G. (2012). Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of Asaiabacterial symbionts. *BMC microbiology*, 12(1), 1-8.

12. Da Mota, F. F., Marinho, L. P., Moreira, C. J. D. C., Lima, M. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., ... & Azambuja, P. (2012). Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), e1631.
13. Díaz, S., Villavicencio, B., Correia, N., Costa, J., & Haag, K. L. (2016). Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-11.
14. Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735.
15. Flores-Villegas, A. L., Salazar-Schettino, P. M., Córdoba-Aguilar, A., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Rojas-Wastavino, G. E., Bucio-Torres, M. I., & Cabrera-Bravo, M. (2015). Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bulletin of Entomological Research*, 105(5), 523-532.
16. Franzim-Junior, E., Mendes, M. T., Anhô, A. C. B. M., da Costa, T. A., Silva, M. V., Hernandez, C. G., ... & Oliveira, C. J. F. (2018). Biology of *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) to other conditions than that encountered in their native habitat. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(3), 262.
17. García-Mares, J. I., González-Acosta, C., Peralta-Rodríguez, J., Correa-Morales, F., Barón-Olivares, H., & Moreno-García, M. (2022). Increased intradomiciliary incidence of triatomine and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in Central Mexico. *Acta zoológica mexicana*, 38.
18. Gumiel, M., Da Mota, F. F., Rizzo, V. D. S., Sarquis, O., Castro, D. P. D., Lima, M. M., ... & Azambuja, P. (2015). Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-17.
19. Guarneri, A., & Lorenzo, M. (Eds.). (2021). *Triatominae-The biology of chagas disease vectors* (pp. 345-386). Cham: Springer.
20. Guarneri, A.A., Schaub, G.A. (2021). Interaction of Triatomines with Their Bacterial Microbiota and Trypanosomes. In: Guarneri, A., Lorenzo, M. (eds) *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. *Entomology in Focus* (5). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64548-9_15

21. Jiménez-Cortés, J. G., García-Contreras, R., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., López-Jácome, L. E., Franco-Cendejas, R., ... & Salazar-Schettino, P. M. (2021). Bacteria cultured from the gut of *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae), a triatomine species endemic to Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 35(3), 478-483.
22. Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V. A., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2014). Insect gut microbiome—An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S16-S21.
23. Lent, H. y Wygodinsky, P. (1979). Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and THEIR significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*. New York, USA
24. Li, H. Yu, Y. Zhang, J. Wang, Y. Zhang, L. Zhai, J. & Zhang, Y. (2023). Gut microbiota influences feeding behavior via changes in olfactory receptor gene expression in Colorado potato beetles. *Front. Microbiol.* 14:1197700. doi: 10.3389/fmicb.2023.1197700
25. Lima, M. S., Laport, M. S., Lorosa, E. S., Jurberg, J., Dos Santos, K. R. N., da Silva Neto, M. A. C., ... & Atella, G. C. (2018). Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9), e0006739.
26. Lima, M. S., Laport, M. S., Lorosa, E. S., Jurberg, J., Dos Santos, K. R. N., da Silva Neto, M. A. C., ... & Atella, G. C. (2018). Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9), e0006739.
27. López-Ordóñez, T., Flores-López, C. A., Montejo-Lopez, R., Cruz-Hernandez, A., & Connors, E. E. (2018). Cultivable bacterial diversity in the gut of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*: identification of possible bacterial candidates for a paratransgenesis approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 174.
28. Mann, A.E. Mitchell, E.A. Zhang, Y. (2020). Comparison of the bacterial gut microbiome of north American *Triatoma* spp. with and without *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 364.
29. Mapa de identificación bacteriana. (2023). Abis online, Bacterial Identification Schems. Recuperado de REGNUM PROKARYOTAE - Identification maps (tgw1916.net)
30. Martínez-Ibarra, J. A., Noguera-Torres, B., García-Benavidez, G., Vargas-Llamas, V., Bustos-Saldaña, R., & Montañez-Valdez, O. D. (2012). Bionomics of populations of *Meccus*

- pallidipennis (Stål), 1872 (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 37(2), 474-477.
31. Monteiro, C. C., Villegas, L. E. M., Campolina, T. B., Pires, A. C. M. A., Miranda, J. C., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2016). Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites & vectors*, 9, 1-6.
 32. Moreno-Valencia, F. D. Plascencia-Espinosa, M. A. & Muñoz-Rojas, J. (2018). Isolation and screening of plant growth promoting bacteria for their application in forest species. *Mexican Journal of Biotechnology* 3(3):36-53. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.3.36>
 33. Morfología colonial. (2021). Morfología de las Colonias Bacterianas. Recuperado de <https://ajorepare.blogspot.com/2021/05/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.html>
 34. Montoya-Porras, L. M., Omar, T. C., Alzate, J. F., Moreno-Herrera, C. X., & Cadavid-Restrepo, G. E. (2018). 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. *Acta Tropica*, 178, 327-332.
 35. Nicholson, J.K. Holmes, E. Kinross, J. Burcelin, R. Gibson, G. Jia, W. & Pettersson, S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267. DOI: 10.1126/science.1223813
 36. Ramírez, L. C. C., Lozano, L. C., & Duarte, S. Q. (2022). Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. *Nova*, 20(39), 121-150.
 37. Rio, R. V., Attardo, G. M., & Weiss, B. L. (2016). Grandeur alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends in parasitology*, 32(9), 739-749.
 38. Rodríguez-Ruano, S. M., Škočová, V., Rego, R. O., Schmidt, J. O., Roachell, W., Hypša, V., & Nováková, E. (2018). Microbiomes of North American Triatominae: the grounds for Chagas disease epidemiology. *Frontiers in microbiology*, 9, 1167.
 39. Rodríguez, J. K. (2011) Efecto de la infección por *Trypanosoma cruzi* sobre la Microbiota intestinal de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae), vector de la *Tripanosomosis americana* (Doctoral dissertation).
 40. Rodríguez-Ruano, S. M., Škočová, V., Rego, R. O., Schmidt, J. O., Roachell, W., Hypša, V., & Nováková, E. (2018). Microbiomes of North American Triatominae: the grounds for Chagas disease epidemiology. *Frontiers in microbiology*, 9, 1167.

41. Ricci, I., Valzano, M., Ulissi, U., Epis, S., Cappelli, A., & Favia, G. (2012). Symbiotic control of mosquito-borne disease. *Pathogens and Global Health*, 106(7), 380-385.
42. Ríos, A. M., y Rojas, J. (1991). Morfología e histología del aparato digestivo de *Triatoma mazzottii* usinger (Hemiptera: reduviidae). *Folia Entomológica Mexicana*, (82), 83-92.
43. Sánchez, C. (2006). Una mirada a las enfermedades parasitarias en el país. *Nova*, 4(5).
44. SANT'ANNA, M.R., DARBY, A.C., BRAZIL, R.P., MONTOYA-LERMA, J., DILLON, V.M., BATES, P.A. & DILLON, R.J. (2012). Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One*, 7(8):e42531. doi: 10.1371/journal.pone.0042531.
45. Sasser, D., Epis, S., Pajoro, M., & Bandi, C. (2013). Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathogens and Global Health*, 107(6), 285-292.
46. Schaub GA (2020) Intestinal bacteria/mutualistic symbionts of triatomines—a review. *Mitt Dtsch Ges allg angew Entomol*, 22:191–194
47. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*.
48. Shreiner, A.B. Kao, J.Y. & Young, V.B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(1): 69-75. DOI: 10.1097/MOG.000000000000139
49. Sonenshine, D. E., & Stewart, P. E. (2021). Microbiomes of Blood-Feeding Arthropods: Genes Coding for Essential Nutrients and Relation to Vector Fitness and Pathogenic Infections. A Review. *Microorganisms*, 9(12), 2433.
50. Téllez-Rendón, J., Esteban, L., Rengifo-Correa, L., Díaz-Albiter, H., Huerta, H., & Dale, C. (2023). *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. *Insects*, 14(4), 331.
51. Thatcher, F., y Clarck, D. (1973). Análisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia.
52. Vieira, C. S., Waniek, P. J., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C., & Azambuja, P. (2016). Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, 9, 1-10.
53. Waniek, P. J., Vieira, C. S., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C., & Azambuja, P. (2017). *Trypanosoma cruzi* impairs the antimicrobial activity of saliva and salivary molecules from the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1), e0005365.

54. Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., ... & Knight, R. (2016). Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 1(1), e00009-15.
55. Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 27(11), 514-522.