

# CONTROL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) MEDIANTE ACTINOBACTERIAS FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS

## Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by means of biofilm-forming actinobacteria.

Miguel Constante Bobadilla Alvarez<sup>1</sup>\*, Edwin Julio Palomino Cadenas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Carretera Central km. 1.21; Tingo María, Huánuco, Perú. CP: 10131

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias del Ambiente, Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo", Avenida Centenario 200-Huaraz, Ancash, Perú. CP: 02002

\* For correspondence: mcba\_1122@yahoo.es

Received: 04<sup>th</sup> May 2020. Returned for revision: 2<sup>nd</sup> September 2020. Accepted: 19<sup>th</sup> November 2020.

Associate Editor: Geraldo Andrade-Carvalho

Citation/ citar este artículo como: Bobadilla Alvarez MC, Palomino Cadenas EJ. Control de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante actinobacterias formadoras de biopelículas. Acta Biol Colomb. 2021;26(3):423-438. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.86966>

### RESUMEN

Las actinobacterias incluyen miembros productores de compuestos multipropósitos restringidamente sobreexplotados al género *Streptomyces*. No obstante, es necesario reorientar la exploración de bacterias no estreptomicetas para el uso de nuevos bioagentes ecológicos con miras a evitar redescubrimientos y contrarrestar la resistencia a insecticidas químicos en *Aedes aegypti*. En esta investigación, se caracterizó actinobacterias formadoras de biopelículas para evaluar su dinámica de crecimiento, actividad larvívica y efectos subletales. La identificación, crecimiento y bioactividades de los patógenos se realizaron por cultivos, análisis de imágenes por fotomicrografía y bioensayos. Las biopelículas pertenecen a *Pseudonocardiaceae* (PsA1TA) y *Corynebacteriaceae* (CoA2CA) característicamente dependientes a crecer sobre sustratos con revestimiento cuticular específico. PsA1TA coloniza estructuras membranosas de tórax y abdomen de larvas. Las microcolonias desarrollan infectivamente a biopelículas mono y biestratificadas hasta cubrir cuatro veces la amplitud toracoabdominal (envergadura infectiva entre 1010  $\mu\text{m}$  a 1036  $\mu\text{m}$ ). En contraste, CoA2CA envuelve radialmente estructuras esclerotizadas cefálica y anal al triplicar la amplitud de los órganos infectados (envergadura infectiva: 1820 a 2030  $\mu\text{m}$  y 1650 a 1860  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Las biopelículas ejercen mortalidad diferenciada a todas las etapas larvianas, no obstante, PsA1TA resultó más mortal y virulento frente al segundo estadio (58 %-96 horas,  $LT_{50}$ : 3,4 días), mientras que CoA2CA lo fue sobre el cuarto estadio larval (85 %-96 horas,  $LT_{50}$ : 2,5 días). CoA2CA indujo emergencia incompleta de farados y despliegue de tarsos curvos en adultos emergentes, además de revestir cadáveres larvianos con robustas biopelículas. Los morfotipos actinobacterianos revelan efecto larvívica y subletal en *A. aegypti* por formación de biopelículas.

**Palabras Clave:** bacterias entomopatógenicas, agentes de control biológico, insecticidas microbianos, fiebre del dengue, mosquitos vectores.

### ABSTRACT

Actinobacteria include several ubiquitous members involved in the synthesis of multipurpose bioactive compounds strictly derived from the genus *Streptomyces*. Nevertheless, new bacterial consortia based on non-streptomycetes actinobacteria are needed to be explored in order to avoid rediscoveries and minimize the development of insecticide resistance in *Aedes aegypti*. In accordance with the use of eco-friendly bioagents, in this study biofilm-forming actinobacteria were characterized on the basis of assessment their growth dynamics, larvicidal mortality and sublethal effects. Actinobacteria identification, biofilm growth and larvicidal bioactivities were performed by employing bacterial cultures, photomicrograph-based image analysis and bioassays. Bacterial morphotypes belong to *Pseudonocardiaceae* (PsA1TA) and *Corynebacteriaceae* (CoA2CA), which showed a distinctly substrate-dependent growth. PsA1TA microcolonies were randomly distributed on abdominal and thoracic membranous epicuticle. Afterwards, the thickness of mono- and bi-layered biofilms were increased fourfold the larval thoracoabdominal width (infectious breadth, 1010  $\mu\text{m}$  - 1036  $\mu\text{m}$ ). In contrast, cephalic and anal sclerotized structures were radially encased by CoA2CA biofilms and increased threefold the size of both structures (infectious breadth, 1820 - 2030  $\mu\text{m}$  y 1650 - 1860  $\mu\text{m}$ , respectively). Although biofilms caused dissimilar mortality rates on the four larval instars, PsA1TA exerted highest larvicidal activity and virulence on second instar larvae (58 %-96 hours,  $LT_{50}$ :

3.4 days) y CoA2CA on fourth instar larvae (85 %-96 hours,  $LT_{50}$ : 2.5 days). CoA2CA also induced incomplete release of pharate individuals as well as buckled protruding tarsi in newly emergent adults, whilst larval cadavers were overwhelmingly encased within massive biofilm aggregates. Biofilm-forming actinobacteria performed biolarvicidal activity and sublethal responses in *A. aegypti*.

**Keywords:** Entomopathogenic bacteria, biological control agents, microbial insecticides, Dengue Fever, mosquito vectors.

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la resistencia química de vectores transmisores de enfermedades es un tema relevante en los sistemas de salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2013; Cabezas *et al.*, 2015). Enfocados en América Latina y El Caribe, las causas se relacionan a limitaciones operacionales en el cumplimiento de labores de monitoreo por control químico, con el propósito de evitar altas presiones de selección por insecticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) muy recurrentes en los últimos 80 años (Manjarres y Olivero, 2013; Huijben y Paaijmans, 2017). Tanto el Manejo Integrado de Vectores (MIV) como la Red Mundial de Resistencia de Insecticidas (WIN por sus siglas en inglés), coinciden en señalar el creciente desarrollo de resistencia de poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*, causante de enfermedades de alta morbimortalidad mundial como el dengue, zika y chikungunya (Corbel *et al.*, 2017; Thomas, 2018; Aponte *et al.*, 2019). En este marco previo, urge la necesidad de minimizar el tamaño poblacional del vector al incorporar estrategias de innovación ecoamigables basados en el control biológico (Benelli *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2019).

Los agentes biocontroladores (microbios, invertebrados o vertebrados acuáticos), accionan por selectividad al organismo meta para reducir las poblaciones acuáticas de mosquitos vectores (Saha *et al.*, 2012; Dy *et al.*, 2018; Freimoser *et al.*, 2019). En *A. aegypti* las estrategias a escala microbiana se confinan básicamente a bacterias (*Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), *Lysinibacillus sphaericus*) y hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum*) (Boyce *et al.*, 2013; Jaber *et al.*, 2016; Alkhaibari *et al.*, 2018). Sin embargo, los *Actinomycetales* (“actinomicetos”), con características duales de bacterias y hongos, han mostrado también ejercer función larvicida (Janaki, 2016; Balakrishnan *et al.*, 2017). Las actinobacterias son reconocidas por elaborar el 75 % de principios activos totales descubiertos, de los cuales *Streptomyces* destaca por contribuir entre el 70-80 % de metabolitos secundarios y ser el referente principal de actividades insecticidas (Kumari *et al.*, 2016). No obstante, el enfoque actual recomienda ampliar la reserva de compuestos bioactivos con la búsqueda de otros actinomicetos a fin de evitar redescubrimientos y promover el hallazgo de nuevos antibióticos e insecticidas (Box *et al.*, 1973; Hug *et al.*, 2018). Es de entender, por lo tanto, que al priorizar el uso de cepas de *Streptomyces* en procesos controlados por biorreactores, se está desestimando la exploración de actinobacterias no *Streptomyces* tan igual o

superior al efecto de interés no sólo por la adición de simples bacterias en cultivo, sino a la bioactividad de actinobacterias formadoras de biopelículas no cultivadas y desconocidas en sus mecanismos de control (Paulraj *et al.*, 2016; Sekurova *et al.*, 2019).

En general, las biopelículas constituyen complejas asociaciones microbianas que se desarrollan en ambientes antrópicos y en relaciones comunitarias muy especializadas de los ciclos biogeoquímicos (Ramey *et al.*, 2004; Battin *et al.*, 2016). El éxito ecofuncional con relación a las bacterias de vida libre, radica en el despliegue de propiedades emergentes mediante tres ventajosos atributos: (1) construcción de una autoproducida matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPSs) que facilita la colonización por superficies bióticas e inertes, (2) alta autoorganización y cohesividad estructural mono o multiespecíficas y (3) activación de procesos de adaptabilidad y alta resiliencia a ambientes hostiles reguladas por autoinductores (quorum sensing) (Kostakioti *et al.*, 2013, Nozhevnikova *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 2016). No obstante los perjuicios patogénicos asociados a invasividad en instrumental médico-terapéutico y formación de placa dentaria (Subramanian *et al.*, 2019), los beneficios antes citados se inclinan mayoritariamente en favorecer la exploración de actinobacterias nativas formadoras de biopelículas para continuo aprovechamiento en labores de remediación minera, tratamiento de acuíferos, aguas residuales, antibióticos y síntesis de metabolitos biocidas antivectoriales (Cunningham *et al.*, 2003; Edwards y Kjellerup, 2013).

Miembros de las familias *Pseudonocardiaceae* y *Corynebacteriaceae* incluyen actinobacterias “raras” no *Streptomyces* capaz de formar biopelículas y compuestos bioactivos multipropósitos (Ventura *et al.*, 2007; Tiwari y Gupta, 2014). Aunque el desconocimiento de metabolitos secundarios y bioactividades provienen de especies que crecen en ambientes extremos (ácidos, hidrotermales, hiperáridos), dicha tesis se contrapone con aquellas especies no extremófilas que también demuestran benéficas funciones biocontroladoras (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Orhan y Orhan, 2018). Por ejemplo, los estudios refieren la síntesis de antifúngicos poliénicos por miembros *Pseudonocardiaceae* frente a *Escovopsis*, a través de la asociación simbiótica de biopelículas en el integumento de la hormiga *Atta* (Ishak *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2013). Del mismo modo, *Saccharopolyspora* y *Saccharomonospora* son claros modelos actinobacterianos que ejercen neurotoxicidad e ingesta larvicida selectiva por espinosinas en larvas de culcideos (Kirst, 2010; Karthik *et al.*, 2011). De otro lado, en

*Corynebacteriaceae* el limitado ejemplo larvicida sobre *Aedes* es el proveniente de aislados de *Corynebacterium sp.* (Nabar y Lokegaonkar, 2015). Este grupo opera preferentemente en forma de patógenas biopelículas en entornos intrahospitalarios, mientras otras especies, predisponen hábitos preferenciales de acercamiento de mosquitos al huésped al modificar compuestos orgánicos volátiles desprendidos de la piel, o son resistentes-tolerantes al cromo hexavalente (Coyle y Lipsky, 1990; Viti *et al.*, 2003; Busula *et al.*, 2017). De trascendencia en nuestros objetivos son las recientes características ecotróficas de ambas familias para biotransformar o englobar xenobióticos aromáticos derivados de dioxanos, tetrahidrofuranos y organoclorados (Chen *et al.*, 2016; Ivshina *et al.*, 2017) además de degradar polímeros recalcitrantes como celulosa o quitina de artrópodos (Shivlata y Satyanarayana, 2015; Inoue *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2020). La adherencia de biopelículas actinobacterianas que determinen cambios en estructuras quitínicas cuticulares de *A. aegypti*, sumado a la actividad insecticida previamente probada en bioensayos pilotos, son abordados en este estudio en demanda a la necesaria búsqueda de nuevos entomopatógenos bacterianos no *Streptomyces*.

El análisis bioprospectivo de biopelículas habitables en vectores inmaduros acuáticos, constituye la etapa inicial de nuestro estudio relativo a caracterización biológica del patógeno, aspectos que han sido pobremente investigados en organismos meta como *A. aegypti* (Vivekanandhan *et al.*, 2018; Zothanpuia *et al.*, 2018). En el entendido que la interacción actinobacteria y huésped díptero acuático se desarrolle en términos de disminuir el crecimiento poblacional de etapas inmaduras (Ettoumi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019), postulamos que la relación patógeno-vector confiera favorables respuestas de mortalidad por biopelículas de actinobacterias no *Streptomyces* y aproximar en presuntivos modos de acción y patogenia. Por lo tanto, la investigación se desarrolló bajo los objetivos de caracterizar el crecimiento de biopelículas, cuantificar los niveles de mortalidad y virulencia sobre larvas y evaluar los efectos subletales en adultos de *A. aegypti*. La comprensión de los mecanismos básicos de biocontrol fomentará investigaciones direccionadas a diseñar procesos biotecnológicos que identifiquen rutas metabólicas de alta eficiencia en la síntesis de nuevos principios bioinsecticidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de formas infectivas de actinobacterias

Se seleccionaron larvas de *A. aegypti* infectadas por estructuras análogas a micelios fúngicos. Las larvas infectadas se mantuvieron aisladas en un bioterio de corredor único, anexo al Laboratorio de Microscopía de

la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú. Se distinguieron dos tipos de infección de acuerdo con la distribución de los elementos infectivos en el cuerpo de la larva y al estadio al cual infectaba. En base a estos criterios, las larvas se separaron en recipientes estériles para el traslado al laboratorio.

### Aislamiento y cultivo

Los procedimientos de aislamiento, cultivo y caracterización microbiana se efectuaron en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, Huaraz, Perú. La extracción de las estructuras por escisión del tejido cuticular larvario se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal, etiquetándolas por PsA1TA y CoA2CA. Luego de lavar por tres minutos con hipoclorito de sodio al 1 % y agua salina isotónica estéril, se procedió a agitación y homogenización en sistema vórtex en modo continuo por cinco minutos. Posterior al calentamiento a 70 °C por 15 minutos, se tomó 1 mL del homogenizado y se inocularon alícuotas de 100 µL a partir de diluciones seriadas al décimo hasta 10<sup>-4</sup>. Por diseminación, se añadió cada alícuota en placas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud Modificado Difco™ con cloranfenicol, medio de cultivo específico para hongos y Agar Nutritivo Merck para el crecimiento no selectivo de bacterias (Whitman *et al.*, 2012). Se realizó luego una resiembra en Agar Almidón Caseína (AAC) suplementado con ácido nalidíxico (10 µg. mL<sup>-1</sup>), nistatina (50 µg. mL<sup>-1</sup>) y cicloheximida (10 g. mL<sup>-1</sup>) como medio no selectivo de actinobacterias (Küster y Williams, 1964; Ay *et al.*, 2017; Parada *et al.*, 2017). Los inóculos incubados a 26 °C entre 15 a 20 días respondieron adecuadamente a los medios. La selección de dos morfotipos entre cuatro se basó en la visualización de cepas con mayores respuestas competitivas por asimilación de nutrientes, rápida aparición del micelio y mayor cobertura superficial de crecimiento en el cultivo (Hibbing *et al.*, 2010; Lloyd y Allen, 2015). Los cultivos se prepararon según las instrucciones del fabricante: autoclavado por diez minutos a una atmósfera de presión a 121 °C ajustado a pH 7,0 ± 0,2 para agar Sabouraud Modificado Difco™ y autoclavado a 121°C por 20 minutos y pH 7,3 ± 0,2 para Agar Nutritivo Merck.

### Caracterización de colonias y biopelículas

La determinación taxonómica de bacterias coloniales y en biopelículas se llevó a cabo por fotomicrografías, reacciones por tinción Gram y Ziehl-Neelsen, presencia o ausencia de micelio, tipología de elementos reproductivos e hifas, color de la colonia, forma del borde, aspecto y presencia de pigmentos difusibles (Whitman *et al.*, 2012; León *et al.*, 2016). Además, la biopelícula se caracterizó por su morfología, dimensiones, disposición y extensión corporal superficial en larvas y pupas.

## Análisis de progresión de biopelículas

La medición del crecimiento de biopelículas se realizó por captura de individuos visiblemente infectados por el micelio. El montaje en fresco de 30 individuos infectados limitó el uso de cubreobjetos para evitar el daño de la estructura micelar, previo al secuenciado de imágenes por microscopía de luz (Obert *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 2017). El secuenciado de imágenes permitió cuantificar diariamente el crecimiento por extensión superficial epicuticular de las biopelículas en cada estadio larval. Se realizó una captura fotográfica por reemplazo de individuos infectados lo que permitió ampliar la representatividad muestral ( $n=30$ ) y promediar el crecimiento de la biopelícula por momento de evaluación (24, 48, 72 y 96 horas). La irregular distribución en el sustrato biótico y dispareja ganancia en masa de la biopelícula PsA1TA (patrón de agregado fractal), dificultó situar un punto preciso de continuidad de la medición del crecimiento desde la interfase biopelícula-epicutícula. El crecimiento de la biopelícula, por lo tanto, se estimó indirectamente por cobertura superficial del órgano afectado expresado en porcentaje. En contraste, el crecimiento radialmente fijo de la biopelícula de CoA2CA en la estructura consistió en la medición desde un punto definido y central de la superficie de la estructura infectada, la cual se expresó en micras y complementariamente en porcentaje. El incremento diario radial de la biopelícula permitió continuar acertadamente la medición del crecimiento en los tiempos establecidos. El crecimiento de ambas biopelículas se visualizó con capturas fotográficas de un microscopio binocular BX50 Olympus®, Japan, equipado con cámara digital SC30 Olympus (3,3 mp), además del uso del método de calibración espacial de fotomicrografías a escala conocida del software de dominio público ImageJ 1.52a (NIH, USA) (Schneider *et al.*, 2012). Se utilizó, también, un estereomicroscopio Olympus® SZX7.

## Crianza de *A. aegypti*

El sistema de crianza larval procedió de un lote generacional F5 de adultos. La alimentación larvaria consistió en un balance nutricional en polvo para peces ornamentales, previamente esterilizado en estufa a 160 °C por dos horas. La crianza aséptica del vector en todas sus fases para el establecimiento del bioensayo se llevó a cabo conforme a protocolos estándar (Gerberg *et al.*, 1994; Imam *et al.*, 2014) en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva entre los meses de enero a abril de 2018.

## Bioensayos larvicidas

Las unidades experimentales se constituyeron por vasos con solución de prueba e individuos larvales del I al IV estadio y pupas. Cada unidad integrada por 20 individuos se sometió por triplicado al estímulo microbiano, más el respectivo

grupo control con agua potable declorinada. Se tomó como concentración única  $3 \times 10^8$  UFC/mL de suspensión de actinobacterias en 199 mL de agua (200 mL de solución de prueba). La mortalidad se registró a intervalos de 24 horas hasta las 96 horas. Todos los grupos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ( $26,0 \pm 0,5$  °C) y humedad relativa (75 a 80 %). La nula reacción ante la suave punción con estilete en el tórax de larvas y cefalotórax en pupas indicó la mortalidad de los individuos, la que fue corregida por la fórmula de Abbott cuando en el grupo control se situó entre 5 a 10 % (Abbott, 1925; World Health Organization, 2005):

$$\%Mortalidad\ corregida = \frac{\%Mortalidad\ en\ el\ tratamiento - \%Mortalidad\ en\ el\ grupo\ de\ control}{100 - \%Mortalidad\ en\ el\ grupo\ de\ control} \times 100$$

## Efectos subletales y saprotrofia

Los efectos subletales expresados en porcentaje se extendieron por tres días desde el término del bioensayo larvicida, en el que se incluían descripciones morfológicas de signos atípicos de locomoción, malformaciones en la preemergencia y emergencia de los individuos (WHO, 2005; Amarasekare y Shearer, 2013). La extensión de la respuesta infectiva posmortem de larvas, permitió determinar preliminarmente cual de los morfotipos es potencial saprófito degradador de quitina.

## Análisis estadístico

Se empleó el ANOVA de un factor con medidas repetidas con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) entre la mortalidad larval y tiempos de exposición a las 24, 48, 72 y 96 horas (Hothorn, 2014). Los supuestos del ANOVA se comprobaron al verificar la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks (menor a 50 sujetos por unidad experimental) y esfericidad al emplear la prueba de Mauchly ( $p < 0,05$  existen diferencias estadísticamente significativas en la igualdad de varianzas y  $p > 0,05$  no existen diferencias estadísticamente significativas en la igualdad de varianzas). Las comparaciones post-hoc se estimaron con la prueba Fisher LSD ( $p = 0,05$ ). Los Tiempos Letales medios  $\pm$  Desviación Estándar ( $TL_{50} \pm DE$ ) se calcularon por análisis Probit. Además, se estableció la prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrado ( $X^2$ ) y valor de probabilidad  $p < 0,05$ , con diferencias significativas en el efecto infectivo de las cepas, o  $p > 0,05$  con ninguna diferencia significativa en dicha acción, bajo un nivel de confianza del 95 %. Así también, se determinó el Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) como ajuste del modelo entre variables. Todo el análisis estadístico se procesó con el software libre R ver. 3.5.2 for Windows (R Project for Statistical Computing) (Crawley, 2015).

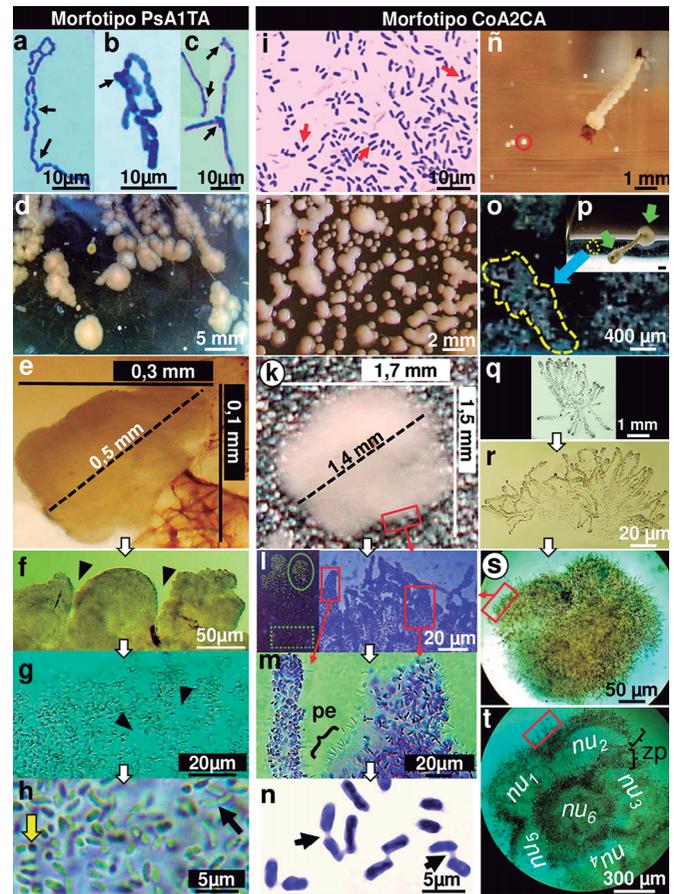
## RESULTADOS

### Morfología de colonias y biopelículas

El estudio abordó la identificación de patógenos a nivel de familia, caracterización de la morfología colonial y biopelículas de actinobacterias. Se seleccionaron dos morfotipos entre cuatro, en razón a la viabilidad de crecimiento en placas y rápido desarrollo micelial.

Los morfotipos emergieron dentro de las 36 horas, mientras los restantes superaron las 72 horas. Luego de diez días de desarrollo de los cultivos, se definieron dos morfotipos muy consistentes. El primero, rotulado PsA1TA, son formas Gram (+) no ácido alcohol resistente, con micelio aéreo y del sustrato constituyéndose a menudo por cadenas bacilares [Diam.: 0,9-1,2  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 1,0  $\pm$  2,71),  $n$  = 50]. El micelio aéreo de color cremoso y del sustrato amarillo-claro, no produce pigmento difusible, esporangio o pseudoesporangio. En ocasiones los segmentos de las hifas del sustrato con ligero abultamiento, pero en conjunto, forman cadenas cortas con angulaciones en zig-zag (Fig. 1a). El micelio aéreo relativamente ramificado con extremos terminales en "Y", crece fragmentándose en formas abastionadas y cocoides no flageladas, forma brotes laterales y apicales (Fig. 1b-c) para luego alargarse y constituir nuevos segmentos. La colonia muestra elevación convexa, margen de entero a lobulado, borde liso-redondeado con aspecto pulverulento cerebriforme [(Diam.: 3,2-6,1 mm ( $\bar{X}$  = 4,8  $\pm$  1,1),  $n$  = 50] (Fig. 1d). Todas las características revelaron corresponder a representante *Pseudonocardiaceae*. Bajo estereofotografías, las biopelículas PsA1TA son blanquecinas, verrugosas, esferoidales [Diam.: 182,9-215,1  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 201,6  $\pm$  2,3),  $n$  = 25] y elipsoidales [Diam. 479,3-522,8  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 504,1  $\pm$  5,5),  $n$  = 25] (Fig. 1e). La biopelícula destaca por su ordenamiento microlobular surcado (Fig. 1f, punta de flechas) de superficie relativamente envainada y lisa (Fig. 1g), en cuyo neblinoso lumen crecen dos tipos bacterianos no flagelados: bacilar [Long. 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 0,7  $\pm$  0,9); diam. 0,3-0,4  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 0,37  $\pm$  1),  $n$  = 50] y coccoide [Diam.: 0,4-0,6  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 0,5),  $n$  = 50] (flecha negra y amarilla, Fig. 1h) densamente distribuidos en la matriz ininterrumpida.

El segundo morfotipo asignado CoA2CA, son bacilos Gram (+) [Long.: 2,1-4,9  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 3,6  $\pm$  0,31); diam.: 0,6-1,4  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$  = 1,2  $\pm$  0,12),  $n$  = 50] rectos a ligeramente curvos y evidente pleomorfismo caracterizados por ser células individuales, en pares, paralelas, adjuntas en pequeños agregados y conectadas en el extremo polar por una delgada franja transparente que divergen en formas "V" e "Y" (Fig. 1i, flechas rojas). El morfotipo no es ácido alcohol resistente, no forma micelios, esporas, flagelos y gránulos policromáticos. La colonia es blanco-rosácea, redondeada, elevación convexa y borde entero, liso no pulverulento [Diam.: 1,8-5,5 mm ( $\bar{X}$  = 3,9  $\pm$  2,7),  $n$  = 50] (Fig. 1j) y ausente de pigmento difusible. Las características pertenecerían a representante



**Figura 1. Caracterización de colonias bacterianas y biopelículas.**  
**Morfotipo PsA1TA (Fig. a-h):** Las cadenas bacterianas forman angulaciones en zig-zag (a) y la organización de las hifas aéreas en cadenas bacilares crecen con abultamientos apicales o laterales (b y c) (flechas). En agar, la bacteria desarrolla a colonias pulverulentas de color blanco cremoso (d), mientras que la biopelícula infectiva muestra forma verrucoide (e). La ampliación secuencial de la biopelícula muestra superficies con bordes lobulados (f, punta de flechas) y ligeros halos de EPS en el lumen (g, punta de flechas), en el que albergan formas bacterianas bacilares y cocoides (h, flechas negra y amarilla). **Morfotipo CoA2CA (Fig. i-t):** Las células en cultivo se disponen en "V", "Y" y en paralelo (i, flechas). La colonia de superficie pulida exhibe un color blanco-rosáceo (j), cuya biopelícula emite un patrón morfológico algodonoso (k). La imagen en negativo (izquierda) con la imagen coloreada de azul (derecha) de la figura compuesta (l) contrasta la alta densidad bacteriana del estrato apical de las hifas superficiales de la biopelícula radial. A mayor escala, las hifas digitiformes proyectan conspicuos elementos filiforme similares a espinas (pe) que rodean al conjunto bacteriano bacilar unido polo a polo por un tenue mucilago entre dos o tres integrantes bacterianos (n, flechas). CoA2CA induce la formación de bioaglomerados suspendidos (ñ, círculo rojo), adosados al sustrato de borosilicato (o, interlineado amarillo) e infectando el sustrato biótico del vector (p, flechas verdes). El morfotipo se organiza jerárquicamente en micelios dispersos (q), grumos (r) a gránulos esféricos (s) o arrosados (t). La ampliación de las hifas radiales (l), refleja la similitud morfológica entre biopelículas infectivas sésiles (k) y gránulos esféricos flotantes (s), superficies resaltadas por subrecuadros rojos. zp: zona pilosa, nu: núcleo.

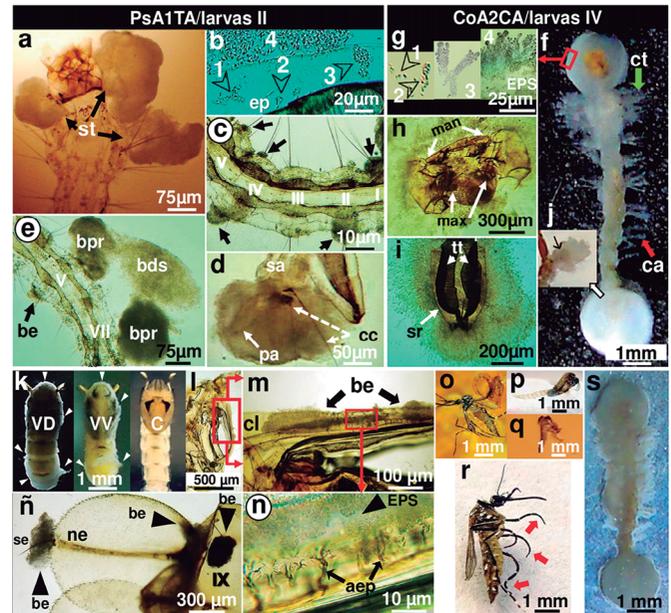
*Corynebacteriaceae*. Al estereoscopio la biopelícula CoA2CA es blanca, esferoidal y apariencia algodonosa [diam. 0,9-1,5 mm ( $\bar{X}$  = 1,27±0,4),  $n$  = 25, Fig. 1k). Hifas entrecruzadas de diversos tamaños conforman el interior y exterior de la biopelícula. Desde un plano longitudinal, el estrato apical de las hifas superficiales exhibió densos agregados bacterianos, contrariamente al estrato inferior, con menor densidad y mayor interseparación celular (Fig. 1l, imagen izquierda). El interior de la biopelícula se estructuró de compactas y entretrejidas capas de hifas, contrariamente a las laxas proyecciones superficiales filamentosas de las hifas (Fig. 1l, imagen derecha con tinción azul), ornamentadas de procesos espinosos filiformes (Fig. 1m). Al igual que su forma colonial, las bacterias no forman flagelos, son abastoadas [Long.: 2,5-4,4  $\mu$ m ( $\bar{X}$  = 3,2 ± 0,54); diam.: 0,8-1,2  $\mu$ m ( $\bar{X}$  = 1,0 ± 0,1),  $n$  = 50], con disposición individual, par o triple y ligeros quiebres angulares en “V” e “Y”, polarmente adheridas por un mucílago semitransparente (Fig. 1n, flechas), que en conjunto se insertan en la matriz homogénea, traslúcida y no septada de las hifas envainadas.

El morfotipo exhibió agregados microbianos flotantes y sésiles. Las formas flotantes se dispersan por la columna de agua (Fig. 1ñ, círculo rojo), mientras las sésiles, se adhieren a sustratos bióticos de larvas (Fig. 1p, flechas verdes) y abióticos de vidrio de borosilicato (Fig. 1o, interlineado amarillo). Las formas dispersivas adquieren complejos entramados de hifas y crecen similarmente al modelo no coagulativo de gránulos (Fig. 1q-1t). Las hifas incrementan en densidad al formar micelios filamentosos (Fig. 1q) y aglomerados (Fig. 1r), previos a la síntesis de gránulos esféricos (Fig. 1s) y arrosados (Fig. 1t) de alta organización. La disposición central (o nuclear, nu) de los gránulos arrosados es de apariencia polinuclear con hifas sin células, en tanto la periférica, similar a la zona pilosa (zp), corresponde a la superficie radial de alta densidad celular. Los gránulos esféricos flotantes (Fig. 1s) y biopelículas infectivas (Fig. 1k) denotan similitud estructural superficial al ser ampliadas por la Fig. 1l.

### Dinámica infectiva de biopelículas y efecto posmortem

En esta etapa se determinó la dinámica de crecimiento infectivo de biopelículas y los efectos físicos inmediatos o mediatos de control en inmaduros. A diferencia de los estadios larvales I (L-I) y III (L-III), las etapas II (L-II) y IV (L-IV) se seleccionaron como modelos representativos de análisis por la mayor sensibilidad infectiva y marcados cambios morfológicos. Los exámenes microscópicos revelaron que las bacterias evolucionan a biopelículas según el tipo de revestimiento cuticular del órgano y estadio larval. La ausencia de conductos tróficos de soporte de los patógenos facilitó el directo anclaje epicuticular de microcolonias en etapas tempranas de la infección para impulsar la extensión superficial de biopelículas sobre el sustrato quitínico membranoso o esclerotizado del vector. En L-II, PsA1TA

induce la acción infectiva de biopelículas en tórax y abdomen (Fig. 2a-2e) al experimentar las etapas de desarrollo (Fig. 2b) que incluyeron: adherencia de individuos microbianos al sustrato (1), formación de microcolonias (2), elongación (3) y maduración (4). En general, la colonización inicia al conformarse microagregados exactamente en la placa basal



**Figura 2. Crecimiento infectivo de biopelículas en *A. aegypti*. Panel PsA1TA/larvas II (Fig. a-e).** Las flechas apuntan el afloramiento de biopelículas en segmentos torácicos (st) (a) y proliferan conforme la secuencia del ciclo de colonización: 1, adhesión monoestratificada de células en la epicutícula (ep); 2, microcolonias; 3, elongación; 4, maduración (b). Numerosas microcolonias emanan desde las placas basales de setas abdominales (c, fechas negras) hasta alcanzar prominentes biopelículas en el segmento anal (sa), papila anal (pa) y cerdas caudales (cc) (d). Estados avanzados de colonización del morfotipo incluye la formación de bicapa de biopelículas proximal (bpr), distal (bds) y las recientemente emergentes (be) a lo largo del abdomen (e). **Panel CoA2CA/larvas IV (Fig. f-j).** El morfotipo compenetra radialmente la zona céfalo-caudal y superficialmente el tórax y abdomen del vector (f), impulsado por el ciclo de crecimiento en cuatro etapas (1 a 4), tan igual como PsA1TA (g). Aquí, la biopelícula se acompaña de halos de EPS similarmente a como infecta las mandíbulas (man) y maxilares (max) (h), sífon respiratorio (sr) (i) y silla anal (j) donde se señala el punto de origen de la biopelícula (flecha negra). El panel entre las figuras k a ñ muestra la infectividad de CoA2CA en pupas, mientras que las figuras o a r, los efectos subletales en adultos. La biopelícula cubre homogéneamente la superficie de pupas al observarlas en vista dorsal (VD) y ventral (VV) cuando se compara con el control (C) (k). La extracción de la exuvia (l) se amplía para indicar que en el cefalotórax el cípeo alberga agregados emergentes de biopelículas (be) (m), capaz de producir agrietamiento epicuticular (aep) (n) e invasividad entre la inserción de la seta (se) con la nervadura (ne) de la paleta natatoria, así como en zonas circundantes al IX segmento abdominal (ñ). La respuesta subletal produce individuos farados que emergen erróneamente al adherirse las alas (o), abdomen (p) y región céfalica (q) al interior de la exuvia y, cuando emergen totalmente, dificultan su equilibrio al formar tarsos curvos (r). La figura s, evidencia los restos larvarios profusamente cubiertos con biopelículas. tt: troncos traqueales, ct: cerdas torácicas, ca: cerdas abdominales.

setal del abdomen que es el punto de emergencia de las cerdas laterales (Fig. 2c). Estados avanzados de la infección, las biopelículas originadas en la papila anal compenetraron el segmento anal y cerdas caudales congregándose una integrada biopelícula biestratificada (Fig. 2d). La evolutiva formación de dos conspicuas biopelículas sobrepuestas, una esferooidal proximal (bpr) a la epicutícula y otras elipsoidal distal (bds) a la superficie cuticular, determinaron la grosera extensión lateral del tórax y abdomen de la larva (Fig. 2e). La expresión dual de biopelículas fue indetectable en la cutícula de pupas.

CoA2CA envuelve con densos micelios radiales las regiones altamente esclerotizadas cefálica y anal en L-IV (Fig. 2f). No obstante, a escala microscópica, los elementos conjuntos de infección lo constituyen bacterias simples, microcolonias y biopelículas maduras acompañadas por halos blanquecinos de sustancias poliméricas extracelulares (EPSs) (Fig. 2g, 1-4), tan igual como en PsA1TA. La disposición radial reviste varios artejos esclerotizados de la cabeza que incluyen penachos bucales, mandíbulas, maxilas (Fig. 2h) y partes caudales como sifón respiratorio (Fig. 2i) y silla anal (2j), a diferencia del tórax y abdomen cuyo crecimiento es ligeramente delgado y superficial en sincronía con el aspecto vermiforme de la larva. Como mecanismo de reacción, ambos estadios expresaron arrítmicos y contráctiles movimientos pulsátiles que llevaron a las larvas a golpear la región cefálica contra la anal (material suplementario s1 y s2). En contraste al modo infectivo en larvas, la vista dorsal (VD) y ventral (VV) en pupas no evidenciaron crecimiento radial de CoA2CA, sino tenue y homogéneamente superficial (Fig. 2k) comparado al control. Según el análisis morfológico de la exuvia (Fig. 2l), el crecimiento de microcolonias desde el clípeo (Fig. 2m) hasta rodear el cefalotórax reveló formar fisuraciones epicuticulares (Fig. 2n) acopladas a EPSs. La infección también remontó en la inserción de la nervadura con la seta de la paleta natatoria, IX segmento abdominal (Fig. 2ñ) con extensión a todo el cuerpo.

El efecto subletal de CoA2CA indujo en individuos no sensibles a la acción larvicida desarrollar a adultos farados, término empleado a adultos casi maduros, formados y ocultos en la exuvia de la pupa (Frantsevich *et al.*, 2017). En ellos, las limitaciones físicas incluyeron la interrupción del despliegue de las alas e impedimento de salida del abdomen o tagma cefálico desde la exuvia (Fig. 2o-2q) (material suplementario s3). En algunos casos la completa emergencia a adultos se expresaba por el despliegue de tarsos curvos en todas las extremidades (Fig. 2r, flechas rojas). Además, el morfotipo prolongó su crecimiento a la etapa de degradación de los restos de larvas muertas mediante el recubrimiento (embalming) total del cadáver larvario similar a una “momificación micelar” (Fig. 2s). PsA1TA no produjo acción saprofitica.

## Crecimiento de biopelículas dependiente de sustrato

El desarrollo de biopelículas se planteó en el supuesto de que la adherencia diferencial a la superficie del vector dependa del tipo de revestimiento epicuticular y promueva la detención del crecimiento larvario. Nuestros resultados determinaron que ambas biopelículas afectaron selectivamente el exoesqueleto rígido y blando con preponderancia a estadios específicos del vector. Los signos de degradación se evidenciaron no solo en artejos aislados (partes bucales, antena, cerdas y penachos), sino a extensiones de órganos (ojos compuestos, silla y papilas anales, sifón respiratorio) y regiones cefálica, torácica, abdominal y caudal. Al respecto, la Tabla 1 compara la evolución de biopelículas PsA1TA en zonas con revestimientos no esclerotizados de larvas, con CoA2CA en estructuras no esclerotizadas de larvas y pupas.

PsA1TA coloniza el abdomen de L-I y L-II (7 % y 16 %) desde las 24 horas. A excepción de microcolonias observadas en el abdomen, la extensión de biopelículas continuó marcadamente en tórax y papilas anales desde las 48 horas. En L-I, las biopelículas se acentúan prolíficamente (91-98 %) e impactan íntegramente en L-II (98-100 %) a las 96 horas. Por el contrario, L-III y L-IV no evidencian invasividad a las 24 horas, aunque ligeros indicios en el tórax (3 %), abdomen (2 %) y papilas anales (17 %) con formaciones aisladas de biopelículas que no sobrepasan el 24 %, aparecen entre 48 a 96 horas. L-IV es la etapa de menor proliferación del patógeno y mínimamente alcanzan el 11 % del tórax y 5 % del abdomen. La intensa multiplicación de estratos de biopelículas PsA1TA, llegaron a cuadruplicar el ancho del tórax (450  $\mu$ m - 486  $\mu$ m,  $n = 10$ ), abdomen (275  $\mu$ m - 318  $\mu$ m  $n = 10$ ) y dimensión de papilas anales (22  $\mu$ m x 140  $\mu$ m  $n = 10$ ) de L-II. La amplitud total del ancho del tórax y abdomen más las biopelículas abarcó entre 1010  $\mu$ m a 1036  $\mu$ m de envergadura total infectiva, mientras que la integridad dimensional de la biopelícula que engloba las papilas anales comprendió entre 380  $\mu$ m a 550  $\mu$ m a las 96 horas.

CoA2CA es casi ausente en L-I, L-II y L-III, pero se forma en la región cefálica (cabeza y artejos) y caudal (sifón respiratorio y silla anal) de L-IV a partir de las 24 horas. La biopelícula crece en la cabeza 23 % (270  $\mu$ m), sifón respiratorio 28 % (250  $\mu$ m) y silla anal 26 % (228  $\mu$ m). El crecimiento radial de la biopelícula es proporcional a la estructura que coloniza, por lo que se adjuntan para fines comparativos las dimensiones del órgano afectado. Así, en el sustrato esclerotizado de la cabeza de L-IV (895-929  $\mu$ m de largo y 965-992  $\mu$ m de ancho,  $n = 10$ ), la biopelícula incrementa entre 23 % a 100 % desde 24 horas (270  $\mu$ m) a 96 horas (967  $\mu$ m), lo cual suma una envergadura diametral total de 1820 a 2030  $\mu$ m ( $n = 10$ ) equivalente al doble de la región cefálica. En el sifón respiratorio (867-923  $\mu$ m de largo y 359-375  $\mu$ m de ancho,  $n = 10$ ) y silla anal (292-305  $\mu$ m de largo y 247-263  $\mu$ m de ancho,  $n = 10$ ), la biopelícula alcanza

**Tabla 1.** Evolución del crecimiento de biopelículas en estadios inmaduros de *A. aegypti*.

Horas	Etapa larval	PsA1TA			CoA2CA				Horas	Estructuras pupales esclerotizadas	
		Estructuras larvarias no esclerotizadas			Estructuras larvarias esclerotizadas					Céfalotorax/abdomen/paleta	
		Tórax	Abdomen	Papila anal	Cabeza		Sifón/silla anal			µm	%
	%	%	%	µm	%	µm	%				
24	I	A	7	A	A	A	A	A	24	A	A
	II	9	16	A	A	A	A				
	III	A	A	A	A	A	A				
	IV	A	A	A	270	23	250/228	28/26			
48	I	23	41	26	A	A	A	A	48	25/48/20	26/39/15
	II	34	59	43	A	A	A	A			
	III	3	2	17	A	9	A	A			
	IV	6	A	A	511	56	488/474	52/47			
72	I	54	62	68	A	A	A	A	72	NM	NM
	II	58	66	70	75	6	59/A	4/A			
	III	5	7	19	92	8	338/292	31/29			
	IV	9	A	4	746	79	743/701	89/91			
96	I	92	91	98	A	A	A	A	96	NM	NM
	II	100	98	100	139	18	146/56	21/5			
	III	20	21	23	314	44	552/486	63/45			
	IV	11	5	17	967	100	974/952	100/100			
AIT	II	1010-1036		380-550	NC				NM	NM	
AIT	IV	NC			1820-2030		1650-1860		NM	NM	

A: Ausencia de biopelícula, NM: No medible por emergencia a adulto, NC: No calculado, AIT: Amplitud infectiva total en 96 horas (µm)

a las 24 horas entre el 28 % (250 µm) y 26 % (228 µm), respectivamente, y aumenta a las 96 horas de tres a cuatro veces (974 µm en sifón y 952 µm en silla anal) el tamaño de los órganos al totalizar un diámetro infectivo entre 1650-1860 µm ( $n = 10$ ). El incremento diario de la biopelícula se estimó entre 220 a 260 µm.día<sup>-1</sup> ( $n = 20$ ), es decir, se duplica cada 24 horas con relación al órgano afectado.

Es de resaltar que la biopelícula también invade estructuras esclerotizadas de L-I y L-II, aunque es ausente dentro de las 48 horas. En L-II, los rangos de crecimiento mínimamente abarcaron entre 75 µm a 139 µm (6 % a 18 %) en la cabeza, en tanto fue ligeramente superior en estructuras de la región anal entre 59 µm a 146 µm (4 % a 21%), hasta el término del bioensayo (96 horas) y sin presentar profundas deformaciones corporales. El corto tiempo de duración de la conversión de pupa a adulto, medido entre 51 a 54 horas, solo permitió observar el crecimiento de diminutas microcolonias entre 20 µm a 48 µm (26 % del clipeo cefalotorácico, 39 % del abdomen y 15 % de paleta natatoria) hasta las 48 horas, procediendo luego a la emergencia a adultos.

### Mortalidad larvica y efecto subletal

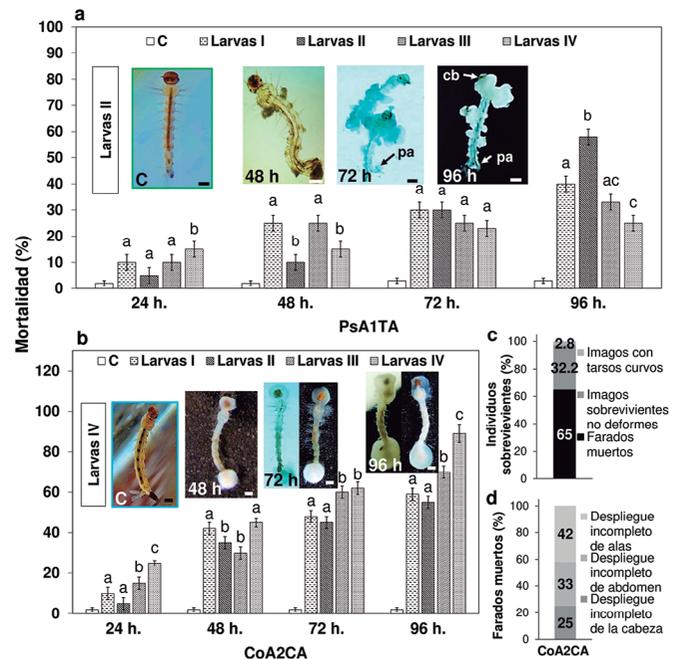
El planteamiento por biocontrol de actinobacterias no *Streptomyces* formadoras de biopelículas, pretendió ser validado por la acción larvica y efecto subletal en *A. aegypti*. En ese sentido, los hallazgos larvicas reflejan dos reacciones específicas al vector: La respuesta orientada a fases tempranas de L-I y L-II ejercida por PsA1TA y aquella susceptible a fases media y tardía de L-III y L-IV producida por CoA2CA, lo que condujo al análisis independiente de la mortalidad por morfotipo. En el bioensayo, la mortalidad no excedió el 3 % respecto al grupo control por lo que evitó corregirse con la fórmula de Abbott. El efecto larvica por PsA1TA empezó a las 24 horas con 15 % en L-IV, no obstante, a las 72 horas se estabiliza a 23 %. En contraste, L-II demostró tener mayor resistencia al estímulo microbiano con 5 % de mortalidad, pero despunta significativamente ( $p < 0,05$ ) a 58 % frente a los demás estadios, los cuales no superaron el 40 % hasta las 96 horas (Fig. 3a). La acción deformadora de la biopelícula sobre L-II es muy evidente a las 72 horas con 30 % de mortalidad y coincide con los visibles signos de continua y

agresiva tumefacción que distorsionan el tórax y abdomen al alcanzar cerca del 60 % a las 96 horas (panel fotográfico Larvas II, Fig. 3a). De otro lado, L-I y L-II mostraron ser menos sensibles a CoA2CA con 10 % y 5 % de mortalidad a las 24 horas, respectivamente, y sin mostrar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con relación a L-III y L-IV (15 % y 25 %). Desde ese momento, el estímulo microbiano confiere respuestas mortales relativamente escalonadas hasta las 72 horas, momento en que L-I y L-II muestran mortalidad significativamente diferente e inferior (45 % a 48 %,  $p < 0,05$ ), respecto a L-III y L-IV (60 % a 63 %,  $p < 0,05$ ). A las 96 horas, y en contra de lo morfológicamente esperado, las biopelículas no revelaron crecer en la región cefálica y caudal de L-I y L-II, por lo que, a pesar de carecerlas, la mortalidad se situó entre 59 % y 55 %, sin mostrar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la evidencia radial es clara en L-III y L-IV, que reaccionan negativamente al severo desarrollo de la biopelícula y, al igual que el morfotipo anterior, demostraría directa correspondencia con la progresiva mortalidad larval. Es decir que mientras los porcentajes de biocontrol se incrementan continuamente entre las 24 y 96 horas (10 % a 70 %, L-III y 15 % a 85 %, L-IV), dicho efecto podría correlacionarse positivamente con el paulatino desarrollo de las biopelículas (panel fotográfico Larvas IV, Fig. 3b).

Los individuos sobrevivientes a la acción larvicida son impedidos de emerger o emergen defectuosamente a adultos lo que evidenció respuestas subletales. El mecanismo de biocontrol sucede al adherirse determinadas regiones del cuerpo adulto al interior de la exuvia. Es decir que del 100 % de pupas sobrevivientes, el 65 % de individuos incluyó farados muertos por emergencia incompleta. De este total, 42 % mostró defecto en el despliegue total del ala derecha o izquierda, 33 % de separación errática de la región abdominal y 25 % por defecto de salida por adherencia de la región cefálica. Asimismo, el 32,2 % de individuos que emergen a adultos alados correspondió a aquellos estructuralmente íntegros y voladores, mientras que el 2,8 % fueron alados, pero morfológicamente limitados a formar tarsos curvos que impidieron el equilibrio corporal y desencadenó en muerte (Fig. 3c-3d).

## Virulencia

La virulencia asociada a actinobacterias tuvo como propósito inocular una cantidad conocida de patógenos y cuantificar el tiempo medio de efecto adverso al vector. De esta forma, demostramos que todas las etapas larvianas reaccionan a los morfotipos a diferentes niveles de tiempo. No obstante, priorizamos la interpretación de la virulencia a L-II y L-IV, por ser los estadios de referencia de mayor invasividad por biopelículas y susceptibilidad larvicida. La aplicación de  $3 \times 10^8$  UFC/mL de inóculo bacteriano produjo diferentes tiempos de control calculados por  $TL_{50}$ . A PsA1TA le tomará 3,4 ( $\pm 0,5$ ) días (81,6 horas) en controlar



**Figura 3.** Comparación de la mortalidad larvicida y respuesta subletal efectuada por actinobacterias. Los gráficos en barras representan el porcentaje de mortalidad larvicida ejercida por PsA1TA (a) y CoA2CA (b) con fotomicrografías adjuntas que reflejan los cambios morfológicos en larvas II y IV hasta las 96 horas. Los porcentajes de mortalidad de individuos sobrevivientes al efecto larvicida son proclives a formar imagos con tarsos curvos, sobrevivientes voladores no deformes y farados muertos (c). Estos últimos, son agrupados por el tipo de anomalía que impide su emergencia (d). En los gráficos a y b, las barras verticales indican el promedio y límites de confianza ( $\bar{X} \pm LC$ ,  $n = 60$  individuos por grupo) al 95 %. Letras diferentes sobre las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de la acción del patógeno por estadio larval, según la prueba de comparaciones múltiples de Fisher LSD. Barras de escala del panel fotográfico de larvas II: 100  $\mu$ m y de larvas IV: 1 mm. cb: cabeza; pa: papila anal.

al 50 % de L-II, mientras que CoA2CA empleará 3,8 ( $\pm 0,4$ ) días (91,2 horas), sin evidentes diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,08$ ). Es decir, ambos morfotipos pueden cuantificar la misma virulencia bacteriana, lo que implicaría en el uso indistinto de cualquier morfotipo para biocontrolar L-II. Aunque L-IV es la etapa de menor sensibilidad a PsA1TA capaz de prolongar el  $TL_{50}$  a 5,3 días (127,2 horas), CoA2CA mostró mayor severidad al emplear 2,5 días (60 horas) comparativamente la mitad del tiempo de virulencia de PsA1TA ( $p = 0,03$ ). De manera semejante responde L-III con  $TL_{50}$  muy próximos a L-IV, establecidos entre 5,8 días (139,2 horas) en PsA1TA y 2,9 días (69,6 horas) en CoA2CA, con diferencias significativas ( $p = 0,02$ ). La homogeneidad de las respuestas patógenas a todas las larvas fue respaldada por la relación-asociación de las variables ( $r^2$ , 72 % a 94 %) que indican la efectiva letalidad bacteriana con alta confiabilidad y ajuste estadístico ( $X^2$ , 1,3 a 8,2). Por lo tanto, los agentes infecciosos mostraron ser patógenos en distintos tiempos de control en dependencia al estado de desarrollo larval.

## DISCUSIÓN

Este estudio caracterizó actinobacterias no *Streptomyces* formadoras de biopelículas y evaluó la acción insecticida y efectos subletales sobre *A. aegypti*. Las bacterias desarrollan voluminosas biopelículas verrugosas y radiales en la epicutícula de los organismos, atributos que confieren distintas dinámicas de desarrollo infectivo y malformaciones corporales en larvas y pupas. Los morfotipos *Pseudonocardiaceae* (PsA1TA) y *Corynebacteriaceae* (CoA2CA) degradan la cutícula en función al tipo de recubrimiento cuticular del órgano del vector, lo que creó dependencia ante la disponibilidad de sustratos duros esclerotizados o blandos no esclerotizados. Aunque la actividad es expresamente larvicida a favor del CoA2CA, el morfotipo induce regulación poblacional poslarval al limitar la emergencia total del adulto desde la exuvia pupal y postración permanente en adultos recién emergidos por formación de tarsos curvos, lo que revela alteraciones del exoesqueleto y respuestas subletales de control.

Si bien nuestras conjeturas sobre el agente causal infectivo partieron sobre la base de patologías fúngicas asociadas a *Bauveria bassiana*, *Coelomomyces stegomyiae* y *Metarhizium anisopliae* (Rueda *et al.*, 2019), dichos supuestos fueron descartados por análisis comparativo dimensional de células en cultivos, elementos reproductivos de micelios e hifas, dinámica patogénica, entre otras características taxonómicas identificables a hongos (Samson *et al.*, 1998; Watanabe, 2010). Por lo tanto, los morfotipos revelaron ser compatibles a actinobacterias *Pseudonocardiaceae* y *Corynebacteriaceae* (Harding *et al.*, 2009; Whitman *et al.*, 2012; Ranjani *et al.*, 2016). En perspectiva, las bacterias cumplen las típicas etapas de formación de biopelículas que comprenden: adhesión al sustrato, formación de microcolonias, elongación y maduración acompañada de EPS (Vila y Rozental, 2016; Yadav y Sanyal, 2019), fases que desencadenaron la infectividad al vector y reproducción bacteriana. Además, la similitud de la morfología celular entre el cultivo colonial e integrantes de la biopelícula PsA1TA relativo a la presencia de elementos cocoides y bacilares en *Pseudonocardiaceae* (Sahin *et al.*, 2014), sugieren la alta versatilidad por codificar el mismo fenotipo ante

ambientes nutricionalmente distintos que abarquen sin mayor exigencia la captura de sustratos de origen no biótico (agar) y biótico (quitina). Del mismo modo aplicaría a la naturaleza pleomórfica y patógena de las bacterias *Corynebacteriaceae* (CoA2CA) (Takano *et al.*, 2008; Tauch y Sandbote, 2014) similarmente observadas en cultivo y asociadas en forma de biopelículas.

Las actinobacterianas formadoras de biopelículas infectivamente asociadas a etapas acuáticas de mosquitos, son un aporte inédito en el control larvicida muy poco estudiado en ambientes de agua dulce en donde los vectores proliferan. No obstante, la asociación es mayormente extendida en la regulación de la metamorfosis de organismos marinos (Rendueles y Ghigo, 2015) e hidrólisis de biopolímeros de bacterias colonizadoras de sustratos (Dang y Lovell, 2020). En nuestro estudio, el biocontrol puede ser explicado en parte por estos puntos de vista, pero principalmente en la interacción con el huésped por asociación epibiótica en términos de respuestas antagonistas (Wahl *et al.*, 2012). La relación epibiótica favorecería en parte el modo de crecimiento de las bacterias estudiadas al evidenciar las fases alternantes sésil (infectiva) y planctónica (disipativa), estrategias que cooperan en la proliferación bacteriana y colonización de nuevos ambientes (Berlanga y Guerrero, 2016). De acuerdo con este modelo, CoA2CA adecuaría negativamente su asociación epibiótica en contra del vector, al abarcar jerarquías de organización de formas infectivas más completas y predominantes tales como micelios filamentosos, grumos y gránulos, similarmente a los propágulos producidos por *Streptomyces* (van der Aart *et al.*, 2018; Veiter *et al.*, 2018). En contraste, el ciclo de vida de PsA1TA reveló no incluir la estrategia disipativa vía planctónica, a pesar de que dichos propágulos suelen evidenciarse en los entomopatógenos *Saccharopolispora* y *Amycolatopsis* integrantes de la misma familia (Singh *et al.*, 2013; Barka *et al.*, 2015). Dado que CoA2CA es demandante por la fase disipativa, dicho mecanismo abarcó el adosamiento a matrices abióticas de vidrio de borosilicato con el desarrollo de películas adherentes y facilitación para la dispersión bacteriana a nuevos espacios potencialmente colonizables ante recambios de fuentes hídricas (Young,

Tabla 2. Virulencia de PsA1TA y CoA2CA en larvas de *A. aegypti*.

E	TL <sub>50</sub> ±DE		p (0,05)	X <sup>2</sup>		R <sup>2</sup>	
	PsA1TA	CoA2CA		PsA1TA	CoA2CA	PsA1TA	CoA2CA
LI	5,1±0,9	3,9±1,2	0,01	2,3	1,3	0,89	0,82
LII	3,4±0,5	3,8±0,4	0,08	5,3	4,3	0,90	0,75
LIII	5,8±0,6	2,9±0,7	0,02	1,4	1,3	0,72	0,93
LIV	5,3±1,0	2,5±0,8	0,03	6,1	8,2	0,92	0,94

E: estadio, TL<sub>50</sub>: tiempo letal medio, DE: desviación estándar, X<sup>2</sup>: Chi-cuadrado, R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación. p: Valor de probabilidad (p < 0,05: existen diferencias significativas, p > 0,05: no existen diferencias significativas). La mortalidad incluye un total de 60 larvas por estadio (20 x 3 repeticiones) mas el grupo control.

2006; Preedy *et al.*, 2014). Aunque los argumentos previos pueden teorizar acertadamente los orígenes ecofuncionales del biocontrol, también es congruente con explicar la formación de gránulos esféricos y arrosados de CoA2CA, que podrían asociarse con la expresión de antibióticos e insecticidas de interés en bioprocesos tecnológicos (Dhakal *et al.*, 2017; van Dissel y van Wezel, 2018), en vista que el morfotipo mostró mayor actividad larvicida. En ese sentido, la liberación de metabolitos larvicidas sería factible de ocurrir, si asumimos que se produzcan en las hifas de grumos y gránulos tal cual se realiza en otros actinomicetos a escala biotecnológica (Singh *et al.*, 2012). En resumen, la extensión de biopelículas sésiles al huésped habilitaría la directa regulación poblacional vectorial e, indirectamente, mediante la diseminación por propágulos, doble ruta de alto poder patógeno muy ventajosa en los propósitos de biocontrol. En ambos casos no se descartaría la emisión de compuestos bioactivos insecticidas.

La quitina es el principal polímero constitutivo del exoesqueleto y primera barrera de defensa ante patógenos en todas las etapas de desarrollo del mosquito (Kaya y Vega, 2012; Nation, 2016; Lopez *et al.*, 2019). De acuerdo con nuestros hallazgos, dos enfoques podrían ser planteados a fin de aproximar actividades de biocontrol sobre la cutícula: La inhibición de la ecdisis y degradación cuticular. En el primer abordaje, ambos morfotipos demostraron detener la ecdisis en todas las etapas larvianas, a excepción de las pupas. En línea con la actividad larvicida, la interrupción de la dinámica estructural de la ecdisis sería el resultado de la relación patogenia-virulencia de PsA1TA (3,4 días/81,6 horas) y CoA2CA (2,5 días/60 horas). El mecanismo, muy vinculado a bacterias entomopatógenas, podría ser potenciado por la presencia de biopelículas infectivas y liberación de quitinasas (Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Oyeleye y Normi, 2018). Si bien ambos supuestos pueden sinergizar el control larvario global, lo evidente fue que, de todos los individuos expuestos, L-II y L-IV destacan por ser altamente sensibles y experimentar intensos cambios morfológicos y mortalidad. El segundo planteamiento estaría respaldado por la erosionabilidad y fragmentación cuticular que apuntarían a indicios degradativos del exoesqueleto. De las observaciones deducimos una relación de compatibilidad asociada a la consistencia del revestimiento epicuticular que confina a las bacterias a establecerse en sustratos de cutículas blandas (PsA1TA) y esclerotizadas (CoA2CA). La afinidad por nichos bióticos con grado variable de esclerotización de la quitina, ha sido bien estudiada en *A. aegypti* (Christophers, 1960; Sugumaran y Semensi, 1987) y se explicaría porque genéticamente la bacteria predispone la síntesis creciente de biopelículas en la medida que sean estimuladas por sustratos quitínicos adicionales y posibiliten la activación extra de complejos enzimáticos desmineralizadores y desproteinizadores del biopolímero (Killiny *et al.*, 2010; Tamadoni y Barzkar, 2018). En consecuencia, se procede

a la degradación enzimática de quitina no endurecida y quitina esclerotizada (Wu *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2017) que revelaría proteólisis de sustratos quitínicos por PsA1TA y CoA2CA. Aunque las investigaciones vinculan a *Streptomyces* poseer la mayor diversidad de enzimas degradantes, en general, las actinobacterias se ubican entre los mejores descomponedores de quitina (Lacombe-Harvey *et al.*, 2018), por lo que nuestro estudio contribuye a ampliar dicha acción a dos morfotipos raros no streptomycetos.

Los individuos sobrevivientes a la acción larvicida responden mediante dos mecanismos: Aquellos expuestos a PsA1TA que expresan pupas y adultos voladores sin daño y los sometidos a CoA2CA que avanzan a adultos farados (preemergentes) y alados no voladores con aberraciones físicas. Los signos por exposición a CoA2CA son coincidentes con los exteriorizados por inhibidores de síntesis de quitina (CSIs) (Farnesi *et al.*, 2012; Salokhe *et al.*, 2012) naturalmente producidos por *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Actinomadura* (Sakuda *et al.*, 1996; Mishra *et al.*, 1998). Las limitaciones asociadas al plegamiento de la cabeza, alas o abdomen dentro de la exuvia se deben a reacciones morfológicas típicas del efecto de CSIs sintéticos (Awad y Mulla, 1984; Fontoura *et al.*, 2012), mientras que los tarsos curvos en adultos alados, a la reducción de cecropina B esencial en la correcta formación cuticular del imago, tal como se ha demostrado en *A. aegypti* (Liu *et al.*, 2017). Por lo tanto, la anulación de la ecdisis larvaria, incompleto despliegue de adultos y expresión de tarsos curvos en alados, sugerirían biocontrol de CoA2CA asociado a transmisión transtadial subletal (Alto y Lord, 2016; Brown *et al.*, 2018) con implicancias en la estabilidad y rigidez del exoesqueleto.

De otro lado, los resultados revelaron que el crecimiento de CoA2CA se extendió a la etapa post mortem, en contraste al nulo desarrollo de PsA1TA. Dado que la degradación de la cutícula esclerotizada es más resistente respecto a la no esclerotizada (Leger *et al.*, 1986; Andersen, 2012), es interesante observar, además, la inespecificidad del morfotipo por elegir sustratos quitínicos en procesos formativos o degradativos. Esto significa que CoA2CA puede degradar estructuras quitínicas de función protectora en el organismo o bajo disponibilidad ambiental como resto orgánico recalcitrante, independientemente del grado de esclerotización. Estas evidencias sugieren que CoA2CA ejerza función quimioprotectora y saprótrfica, capaz de conducirse por rutas quitinoclasticas degradativas diversas y en términos de poder cuantificarse la efectividad degradante de la quitina (Beier y Bertilsson, 2013). No obstante, detalles sobre el metabolismo quitinolítico y productos de degradación quedarían por ser dilucidados en favor del interés industrial farmacéutico, químico y biogeoquímico del C y N.

## CONCLUSIONES

Dos actinobacterias formadoras de biopelículas *Pseudonocardiaceae* (PsA1TA) y *Corynebacteriaceae* (CoA2CA)

confieren actividad larvicida y subletal en adultos de *A. aegypti*. Las biopelículas crecen infectivamente en estructuras cuticulares esclerotizadas y no esclerotizadas que revelaron preferencias tróficas en la adquisición de sustrato. Mientras que PsA1TA construyó densas biopelículas en tórax y abdomen, CoA2CA desarrolló estructuras con disposición radial en las regiones cefálica y anal. Ambos morfotipos ejercen mortalidad al inhibir el avance de las etapas larvarias. PsA1TA fue más mortal y virulento en L-II y CoA2CA lo fue en L-IV. CoA2CA induce respuesta subletal por despliegue defectuoso del adulto farado, en tanto los emergentes muestran desequilibrio por formación de tarsos curvos. A su vez, el crecimiento de CoA2CA se extiende al estado post mortem de larvas que sugieren ser saprófitos, contrariamente a PsA1TA. Dado que las evidencias se derivaron a análisis morfológicos preliminares, los mecanismos exactos de biocontrol en *A. aegypti* deberían ser reconfirmados y elucidados bajo un diagnóstico molecular de los morfotipos, acompañados de alto detalle ultraestructural de la acción infectiva.

## AGRADECIMIENTOS

Al M. Sc. Mario Leyva Collas, jefe del Laboratorio de Calidad Ambiental de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo por el acceso al instrumental y equipo microbiológico de utilidad en el procesamiento y análisis de muestras bacterianas.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Am Mosq Control Assoc.* 1987;3(2):302-303.
- Alkhaibari AM, Maffei T, Bull JC, Butt TM. Combined use of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, and the mosquito predator, *Toxorhynchites brevipalpis*, for control of mosquito larvae: Is this a risky biocontrol strategy? *J Invertebr Pathol.* 2018;153:38-50. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.003>
- Alto BW, Lord CC. Transstadial Effects of Bti on Traits of *Aedes aegypti* and Infection with Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004370. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004370>
- Amarasekare KG, Shearer PW. Laboratory Bioassays to Estimate the Lethal and Sublethal Effects of Various Insecticides and Fungicides on *Deraeocoris brevis* (Hemiptera: Miridae). *J Econ Entomol.* 2013;106(2):776-785. Doi: <https://doi.org/10.1603/EC12432>
- Andersen SO. Cuticular Sclerotization and Tanning. In: Lawrence G, editor. *Insect Molecular Biology and Biochemistry.* 1 ed. London and San Diego: Academic Press, Elsevier B.V; 2012. p. 167-192.
- Aponte A, Penilla RP, Rodríguez AD, Ocampo CB. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. 2019;191:146-154. *Acta Trop.* Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.021>
- Arasu MV, Al-Dhabi NA, Saritha V, Duraipandian V, Muthukumar C, Kim SJ. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *BMC microbiol.* 2013;13:105. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-105>
- Ay H, Nouioui I, Montero MdC, Carro L, Klenk HP, Goodfellow M, et al. *Actinomadura alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2017;110(6):787-794. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0850-6>
- Awad TI, Mulla MS. Morphogenetic and Histopathological Effects of the Insect Growth Regulator Cyromazine in Larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1984;21(4):427-431. Doi: <https://doi.org/10.1093/jmedent/21.4.427>
- Balakrishnan S, Santhanam P, Srinivasan M. Larvicidal potency of marine actinobacteria isolated from mangrove environment against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *J Parasit Dis.* 2017;41(2):387-394. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0812-3>
- Barka EA, Vatsa P, Sánchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff J, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;80(1):1-43. Doi: <https://doi.org/10.1128/mbr.00019-15>
- Beier S, Bertilsson S. Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Front Microbiol.* 2013;4(149):1-12. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>
- Benelli G, Jeffries CL, Walker T. Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects.* 2016;7(4):52. Doi: <https://doi.org/10.3390/insects7040052>
- Berlanga M, Guerrero R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact.* 2016;15(1):165. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop Med Int Health.* 2013;18(5):564-577. Doi: <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>
- Brown LD, Thompson GA, Hillyer JF. Transstadial transmission of larval hemocoelic infection negatively affects development and adult female longevity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Invertebr Pathol.* 2018;151:21-31. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.008>

- Busula AO, Takken W, Deboer JG, Mukabana WR, Verhulst NO. Variation in host preferences of malaria mosquitoes is mediated by skin bacterial volatiles. *Med Vet Entomol*. 2017; 31(3):320–326. Doi: <https://doi.org/10.1111/mve.12242>
- Cabezas C, Fiestas V, García-Mendoza M, Palomino M, Mamani E, Donaires F. Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(1):146–56. Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2015.321.1587>
- Chen P, Zhang L, Guo X, Dai X, Liu L, Xi L, *et al*. Diversity, Biogeography, and Biodegradation Potential of Actinobacteria in the Deep-Sea Sediments along the Southwest Indian Ridge. *Front Microbiol*. 2016;7:1340. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01340>
- Christophers R. *Aedes aegypti* (L) the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press. Bentley House; 1960. 750 pp.
- Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, *et al*. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(2):22. Doi: <https://doi.org/10.3390/jof3020022>
- Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(3):227–246. Doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.3.3.227>
- Crawley M. *Statistics: An Introduction using R*. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. 339 p.
- Cunningham AB, Sharp RR, Hiebert R, James G. Subsurface Biofilm Barriers for the Containment and Remediation of Contaminated Groundwater. *Bioremediat J*. 2003;7(3-4):151–164. Doi: <https://doi.org/10.1080/713607982>
- Dhawal D, Pokhrel AR, Jha AK, Thuan NH, Sohng JK. *Saccharopolyspora* Species: Laboratory Maintenance and Enhanced Production of Secondary Metabolites. *Curr Protoc Microbiol*. 2017(1);44(1):10H.1.1–10H.1.13. Doi: <https://doi.org/10.1002/cpmc.21>
- Du M, Yan ZW, Hao YJ, Yan ZT, Si FL, Chen B, *et al*. Suppression of Laccase 2 severely impairs cuticle tanning and pathogen resistance during the pupal metamorphosis of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2017;10(1):171. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2118-4>
- Dy RL, Rigano LA, Fineran PC. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(6):1605–1613. Doi: <https://doi.org/10.1042/BST20180178>
- Edwards SJ, Kjellerup BV. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(23):9909–9921. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5216-z>
- Ettoumi B, Chouchane H, Guesmi A, Mahjoubi M, Brusetti L, Neifar M, *et al*. Diversity, ecological distribution and biotechnological potential of Actinobacteria inhabiting seamounts and non-seamounts in the Tyrrhenian Sea. *Microbiol Res*. 2016;186-187:71–80. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.006>
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, Rezende GL. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLoS One*. 2012;7(1):e30363. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030363>
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563–575. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(3):387–395. Doi: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000300014>
- Freimoser FM, Rueda-Mejia MP, Tilocca B, Migheli Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35(10):154. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. *Manual for mosquito rearing and experimental techniques*. California: American Mosquito Control Association; 1994. p.41–57.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95–108. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol*. 2009;17(11):475–480. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):15–25. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hothorn LA. Statistical evaluation of toxicological bioassays—a review. *Toxicol Res*. 2014;3(6):418–432. Doi: <https://doi.org/10.1039/c4tx00047a>
- Imam H, Sofi G, Aziz S. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). *Trop Parasitol*. 2014;4(1):53–55. Doi: <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129167>
- Inoue D, Tsunoda T, Sawada K, Yamamoto N, Saito Y, Sei K, Ike M. 1,4-Dioxane degradation potential of members of the genera *Pseudonocardia* and *Rhodococcus*. *Biodegradation*. 2016;27(4-6):277–286. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-016-9772-7>
- Ishak HD, Miller JL, Sen R, Dowd SE, Meyer E, Mueller UG. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles

- in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. *Sci Rep.* 2011;1:204. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep00204>
- Ivshina IB, Kuyukina MS, Krivoruchko AV. Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria and Their Potential in Eco-Biotechnology and Bioremediation. In: Kurtböke I, editor. *Microbial Resources*. London: Elsevier Inc.; 2017. p. 121-148. Doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804765-1.00006-0>
- Jaber S, Mercier A, Knio K, Brun S, Kambris S. Isolation of fungi from dead arthropods and identification of a new mosquito natural pathogen. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):491. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1763-3>
- Jahromi ST, Barzkar N. Marine bacterial chitinase as sources of energy, eco-friendly agent, and industrial biocatalyst. *Int J Biol Macromol.* 2018;120(Part B):2147-2154. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.083>
- Janaki T. Larvicidal activity of *Streptomyces cacaoui* subsp. *cacaoui*-M20 against *Culex quinquefasciatus* (III Instar). *Int J Mosq Res.* 2016; 3(2): 47-51.
- Jurat-Fuentes JL, Jackson TA. Bacterial entomopathogens. In: Vega F, Kaya H. editors. 2 ed. *Insect Pathology*. London: Academic Press. Elsevier; 2012. p. 265-349.
- Karthik L, Gaurav K, Rao KVB, Rajakumar G, Rahuman AA. Larvicidal, repellent, and ovicidal activity of marine actinobacteria extracts against *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex gelidus*. *Parasitol Res.* 2011;108(6):1447-1455. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2193-3>
- Kaya HK, Vega FE. Scope and Basic Principles of Insect Pathology. In: Vega F, Kaya H. editors. 2 ed. *Insect Pathology*. London: Academic Press. Elsevier; 2012. p. 1-12.
- Killiny N, Prado SS, Almeida RPP. Chitin Utilization by the Insect-Transmitted Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(18):6134-6140. Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.01036-10>
- Kirst HA. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot (Tokyo).* 2010;63(3):101-111. Doi: <https://doi.org/10.1038/ja.2010.5>
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(4):a010306. Doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Küster E, Williams ST. Selection of Media for Isolation of *Streptomyces*. *Nature.* 1964; 202(4935):928-929. Doi: <https://doi.org/10.1038/202928a0>
- Lacombe-Harvey MÈ, Brzezinski R, Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(17):7219-7230. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>
- León J, Aponte JJ, Cuadra D'L, Galindo N, Jaramillo L, Vallejo M, et al. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2016;51(1):69-80. Doi: <https://doi.org/10.4067/s0718-19572016000100007>
- Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J Invertebr Pathol.* 1986;47(2):167-177. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90043-1)
- Liu W, Tu W, Lin C, Yang U, Chen Ch. Involvement of cecropin B in the formation of the *Aedes aegypti* mosquito cuticle. *Sci Rep.* 2017;7,16395 Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16625-6>
- Lloyd DP, Allen RJ. Competition for space during bacterial colonization of a surface. *R Soc Interface.* 2015;12(110):20150608. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0608>
- López SBG, Guimarães-Ribeiro V, Rodriguez JVG, Dorand FAPS, Salles TS, Sá-Guimarães TE, et al. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Sci Rep.* 2019;9:4038. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39666-5>
- Mishra SK, Keller JE, Miller JR, Heisey RM, Muraleedharan GN, Putnam AR. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J Ind Microbiol.* 1987;2(5):267-276. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01569429>
- Nabar B, Lokegaonkar S. Larvicidal activity of microbial metabolites extracted from extremophiles against vector mosquitoes. *Int J Mosq Res.* 2015; 2(3): 61-65.
- Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(1):206-224. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>
- Nation J. *Insect Physiology and Biochemistry*. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2016. p. 433-454.
- Nozhevnikova AN, Botchkova EA, Plakunov VK. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology. *Microbiology.* 2015;84(6):731-750. Doi: <https://doi.org/10.1134/S0026261715060107>
- OMS. *Aprendiendo juntos. Sistematización de experiencias sobre control vectorial del dengue en la Amazonia Peruana*. Lima: OPS; 2013. p. 37-38.
- Orhan WN, Orhan DD. Natural Weapons Used against Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. In: Tyagi B, Dharumadurai D, editors. *Microbial Control of Vector-Borne Diseases*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2018. p. 137-166.
- Pang S, Lin Z, Zhang W, Mishra S, Bhatt P, Chen S. Insights Into the Microbial Degradation and Biochemical Mechanisms of Neonicotinoids. *Front Microbiol.* 2020;11:868. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00868>

- Parada RB, Marguet ER, Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev Colomb Biotecnol.* 2017;19(2):7-23 Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Paulraj MG, Kumar PS, Ignacimuthu S, Sukumaran D. Natural Insecticides from Actinomycetes and Other Microbes for Vector Mosquito Control. In: Gopalakrishnan R, Veer V, editors. *Herbal Insecticides, Repellents and Biomedicines: Effectiveness and Commercialization.* New Delhi: Springer; 2016. p. 85-99.
- Preedy E, Perni S, Nipiç D, Bohinc K, Prokopovich P. Surface Roughness Mediated Adhesion Forces between Borosilicate Glass and Gram-Positive Bacteria. *Langmuir.* 2014;30(31):9466-9476. Doi: <https://doi.org/10.1021/la501711t>
- Ranjani A, Dhanasekaran D, Gopinath, PM. An Introduction to Actinobacteria. In Dharumadurai D, Yi J, editors. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.* London: IntechOpen Limited; 2016. p. 3-36. Doi: <https://doi.org/10.5772/62329>
- Rendueles O, Ghigo JM. Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol Spectr.* 2015;3(3):MB-0009-2014. Doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0009-2014>
- Ryan SJ, Mundis SJ, Aguirre A, Lippi CA, Beltrán E, Heras F, *et al.* Seasonal and geographic variation in insecticide resistance in *Aedes aegypti* in southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(6):e0007448. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007448>
- Saha N, Aditya G, Banerjee S, Saha GK. Predation potential of odonates on mosquito larvae: Implications for biological control. *Biol Control.* 2012;63(1):1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.05.004>
- Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A, Koseki K. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces sp.* *Tetrahedron Lett.* 1996;27(22):2475-2478. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84560-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84560-8)
- Salokhe SG, Deshpande SG, Mukherjee SN. Evaluation of the insect growth regulator Lufenuron (Match®) for control of *Aedes aegypti* by simulated field trials. *Parasitol Res.* 2012;111(3):1325-1329. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2968-9>
- Samson RA, Evans HC, Latgé JP. *Atlas of Entomopathogenic Fungi.* Berlin: Springer-Verlag, Berlin; 1988. 187 p.
- Samuels RI, Mattoso TC, Moreira DD. Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. *Commun Integr Biol.* 2013;6(2):e23095. Doi: <https://doi.org/10.4161/cib.23095>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675. Doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shivlata L, Satyanarayana T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front Microbiol.* 2015;6:1014. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>
- Singh KP, Wangikar PP, Jadhav S. Correlation between pellet morphology and glycopeptide antibiotic balhimycin production by *Amycolatopsis balhimycina* DSM 5908. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2012; 39(1):27-35. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0995-7>
- Singh KP, Mahendra AL, Jayaraj V, Wangikar PP, Jadhav S. Distribution of live and dead cells in pellets of an actinomycete *Amycolatopsis balhimycina* and its correlation with balhimycin productivity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(2):235-44. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1215-9>
- Subramanian S, Ryan CH, Sangwook C, Bentley WE, Ghodssi R. Microsystems for biofilm characterization and sensing. A review. *Biofilm.* 2020;2:100015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100015>
- Sugumaran M, Semensi V. Sclerotization of mosquito cuticle. *Experientia.* 1987;43(2):172-174. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF01942839>
- Takano H, Shimizu A, Shibosawa R, Sasaki R, Iwagaki S, Minagawa O, *et al.* Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;81(1):127-134. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1622-z>
- Tauch A, Sandbote J. The Family Corynebacteriaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes.* Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2014. p. 239-277.
- Thomas MB. Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. *BioControl.* 2018;63:61-69. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9815-y>
- Tiwari K, Gupta RK. Bioactive Metabolites from Rare Actinomycetes. In: Rahman Au, editors. *Studies in Natural Products Chemistry.* Vol 41. Oxford: Elsevier B.V.; 2014. p. 419-512. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00014-0>
- Vallet-Gely I, Lemaître B, Boccard F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):302-313. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1870>
- van der Aart LT, Spijksma GK, Harms A, Vollmer W, Hankemeier T, van Wezel GP. 2018. High-resolution analysis of the peptidoglycan composition in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 2018;200(20):e00290-18. Doi: <https://doi.org/10.1128/JB.00290-18>
- van Dissel D, van Wezel GP. Morphology-driven downscaling of *Streptomyces lividans* to micro-cultivation. *Antonie Van*

- Leeuwenhoek. 2018;111(3):457-469. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0967-7>
- Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C. The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(7):2997-3006. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8818-7>
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(3):495-548. Doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Vila TV, Rozental S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: Sultan S, editor. *Fungal Pathogenicity.* London: IntechOpen Limited; 2016. p.1-23. Doi: <https://doi.org/10.5772/62768>
- Viti C, Pace A, Giovannetti L. Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. *Curr Microbiol.* 2003;46(1):1-5. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3800-z>
- Vivekanandhan P, Arunthirumeni M, Vengateswari G, Subramanian M. Bioprospecting of Novel Fungal Secondary Metabolites for Mosquito Control. In: Tyagi B, Dharumadurai D, editors. *Microbial Control of Vector-Borne Diseases.* Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2018. p. 61-89.
- Wahl M, Goecke F, Labes A, Dobretsov S, Weinberger F. The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms. *Front Microbiol.* 2012;3;292. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00292>
- Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 3 ed. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group. 2010. 397 p.
- Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo M, Ludwig W, *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol.5 The Actinobacteria. New York: Springer-Verlag; 2012. 2082 p.
- Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, *et al.* Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol.* 2017;6(4).
- WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WHO; 2005. p. 8-18.
- Wijeyekoon S, Mino T, Hiroyasu S, Tomonori M. Effects of substrate loading rate on biofilm structure. *Water Res.* 2004;38(10):2479-2488. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.005>
- Wu X, Zhan X, Gan M, Zhang D, Zhang M, Zheng X, *et al.* Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell. *Parasitol Res.* 2013;112(5):1929-1934. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3349-8>
- Yadav SK, Sanyal S. Biofilms: The Good and the Bad. In: Kumar S, Chandra N, Singh L, Hashmi MZ, Varma A. editors. *Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p.13-26. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30757-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30757-8_2)
- Young KD. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(3):660-703.
- Zhang B, Wu X, Tai X, Sun L, Wu M, Zhang W, *et al.* Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. *Front Microbiol.* 2019;10:2209. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02209>
- Zothanpuia, Passari AK, Leo VV, Singh BP. Freshwater Actinobacteria: Potential Source for Natural Product Search and Discovery. In: Singh BP, Gupta VK, Passari AK, editors. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications.* Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 67-77. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00004-7>