



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Aislamiento, caracterización y evaluación de la
capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a
hormigas cortadoras de hojas (Formicidae:
Myrmicinae: Attini)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en

Zoología

AUTOR

Cindy Abigail GUTIERREZ ESPINOZA

ASESOR

Jorge LEÓN QUISPE

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gutierrez, C. (2017). *Aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1228
H



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

94

Siendo las 10:05 horas del 05 de octubre de 2017, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** de **CINDY ABIGAIL GUTIERREZ ESPINOZA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **040-EPCB-2017**, la titulando expuso su tesis: **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS ASOCIADOS A HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS (Formicidae: Myrmicinae: Attini)”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18., calificativo: aprobado con mención honorosa. Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** a **CINDY ABIGAIL GUTIERREZ ESPINOZA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 05 de octubre de 2017.

Dra. **DIANA SILVA DAVILA**
(PRESIDENTA)

Mg. **JORGE LEON QUISPE**
(ASESOR)

Blga. **ELENA ARBAIZA PRADO**
(MIEMBRO)

Mg. **ENRIQUE ESCOBAR GUZMAN**
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme disfrutar hasta ahora lo más hermoso de mi vida. Porque sé que siempre iluminará mi camino, brindándome paz y amor.

A mi familia, por su comprensión y por siempre apoyarme durante mi formación académica. A mis padres Hugo y Alicia, quienes son mi fortaleza para nunca rendirme ante cualquier reto, por su amor único, paciencia, comprensión y por enseñarme que en esta vida hay que ser fuertes y luchar frente a las adversidades, y a mi hermano Gianmarco, por sus consejos y por siempre apoyar mis decisiones.

A mi asesor Mg. Jorge León Quispe, por aceptar y guiar mi trabajo de grado, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, estar siempre pendiente de mis avances y por sus enseñanzas durante todo el proceso del presente trabajo.

Al Blgo. Nilver Zenteno, por su colaboración en el muestreo de las hormigas.

Al Dr. James Trager, quien pertenece al Museo de Entomología de Mississippi (EE. UU) y al Blgo. Geancarlos Alarcón, quién pertenece al laboratorio de Entomología de la Universidad Nacional Federico Villarreal, por su colaboración en la identificación de las hormigas.

Al Dr. Julio Santiago y sus colaboradores Marlene, Milan y Yuri, quienes pertenecen al laboratorio de Investigación de Química Orgánica de la UNMSM, por brindarme su apoyo y permitirme el uso de los equipos para la obtención de los extractos orgánicos.

Al Dr. Wilbert Serrano y a los miembros del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Marina de la Universidad Científica del Sur, por su apoyo en el secuenciamiento de las cepas.

Al Mg. Carlos Padilla, Mg. Víctor Jiménez, Lic. Manuel Ramírez y Bach. Adrián Quintana, por su colaboración respecto al análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

A Omar, por tus consejos frente a las adversidades que se presentaron durante este camino de lucha, el cual también formo parte de tu vida, ya que siempre estuviste pendiente de mis aciertos y desaciertos y porque sé que siempre estarás a mi lado cuando más lo necesite.

A mi estimada amiga Ulrike, por tu increíble amistad, consejos y disposición para enseñarme todo lo relacionado a la Microbiología, recuerda que eres un gran ser humano y una excelente profesional.

A mis mejores amigos Antuane y Jhoe, por estar siempre cuando los necesitaba, por escucharme, por sus consejos y por tantos momentos gratos de risas, llantos y demás emociones compartidas en nuestra universidad.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana: Mirko, Claudia, Carolina, Junior, Astrid, Melisa, Sarita, Jessica, Sheyla, Verónica y Nadia; por los increíbles momentos compartidos en el laboratorio, gracias por su ayuda, consejos y por ser parte de mi segundo hogar durante mi etapa universitaria.

Finalmente, gracias a todas las personas que confiaron en mí para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Hormigas cortadoras de hojas	4
2.2. El género <i>Atta</i>	7
2.3. Actinomicetos	9
2.3.1. El Phylum Actinobacteria	9
2.3.2. El género <i>Streptomyces</i>	12
2.3.2.1. Generalidades	12
2.3.2.2. Ciclo de vida	14
2.3.2.3. Metabolismo secundario en <i>Streptomyces</i>	15
2.3.2.4. Producción de metabolitos secundarios por <i>Streptomyces</i>	16
2.4. Principales patógenos de importancia clínica	18
2.5. Antecedentes	22
3. HIPOTESIS	23
3.1. Hipótesis de la Investigación	23
3.2. Hipótesis nula	23
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	24

5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1. Material Biológico	25
5.2. Metodología	25
5.2.1. Recolección de hormigas cortadoras de hojas	25
5.2.2. Determinación taxonómica de las hormigas recolectadas	26
5.2.3. Aislamiento y cultivo de actinomicetos nativos	27
5.2.4. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados	27
5.2.4.1. Caracterización macroscópica	27
5.2.4.2. Caracterización microscópica	28
5.2.5. Producción de enzimas extracelulares por actinomicetos aislados	28
5.2.6. Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo “doble capa”	29
5.2.7. Cultivo continuo para la obtención del extracto orgánico	29
5.2.8. Evaluación de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes	30
5.2.9. Extracción química de compuestos bioactivos	30
5.2.10. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos	31
5.2.11. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos activos	31
5.2.12. Identificación molecular de los actinomicetos seleccionados	32
5.2.13. Análisis estadístico	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Descripción taxonómica de las hormigas colectadas	34
6.2. Aislamiento de actinomicetos nativos	36
6.3. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados	36
6.4. Producción de Enzimas Extracelulares (EEC) por actinomicetos aislados	39
6.5. Prueba cualitativa de antibiosis mediante el bioensayo “doble capa”	43
6.5.1. Actividad antibacteriana	43
6.5.2. Actividad antifúngica	45
6.6. Características de los cultivos continuos de las cepas seleccionadas	49
6.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes	49

6.8.	Obtención de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados	50
6.9.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos	51
6.10.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo	55
6.11.	Identificación molecular de los actinomicetos seleccionados	57
6.12.	Análisis estadístico	59
7.	DISCUSIÓN	66
8.	CONCLUSIONES	78
9.	RECOMENDACIONES	79
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
11.	ANEXOS	94

LISTA DE ABREVIATURAS

- MDR: MultiDrogo-Resistente
- G: Guanina
- C: Citosina
- OMS: Organización Mundial de Salud
- SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina
- BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido
- ERV: *Enterococcus* Resistentes a la Vancomicina
- ATCC: Del inglés: American Type Culture Collection
- mL: mililitro
- μ L: microlitro
- ACZ: Agar Czapeck
- AAC: Agar Almidón Caseína
- HPLC: Del inglés: High Performance Liquid Chromatography
- v/v: Volumen sobre volumen
- ISP: Del inglés: International Streptomyces Project
- TSB: Del inglés: Trypticase Soja Broth
- TSA: Del inglés: Trypticase Soja Agar
- YME: Del inglés: Yeast Malt Extract
- UFC: Unidades Formadoras de Colonia
- mm: milímetros
- p/v: peso sobre volumen
- μ g/mL: microgramos sobre mililitro
- mg/mL: miligramos sobre mililitro
- rpm: revoluciones por minuto
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico

- ARNr: Ácido Ribonucleico ribosómico
- PCR: Del inglés: Polymerase Chain Reaction
- BLAST: Del inglés: Basic Local Alignment Search Tool
- NCBI: Del inglés: National Center por Biotechnology Information
- ANOVA: Del inglés: Analysis of Variance
- TTC: Trifenial Tetrazolium Cloro
- rpoB: Del inglés: RNA Polymerase of subunit B

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nuevos metabolitos aislados de actinomicetos durante el 2003-2005	17
Tabla 2. Características fenotípicas de las 30 cepas de actinomicetos aislados de <i>Atta cephalotes</i> procedentes del distrito Mariano Damaso Beraún-Huánuco, Perú	38
Tabla 3. Producción de enzimas extracelulares de actinomicetos aislados de <i>Atta cephalotes</i> frente a diversos sustratos	42
Tabla 4. Halos de inhibición de actinomicetos aislados frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas por el método “doble capa”	44
Tabla 5. Actividad antifúngica de 30 actinomicetos aislados de <i>Atta cephalotes</i> frente a levaduras del género <i>Candida</i>	46
Tabla 6. Pesos secos de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados	50
Tabla 7. Actividad antifúngica de extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 aislados de <i>Atta cephalotes</i> frente a levaduras de importancia clínica	52
Tabla 8. Actividad inhibitoria de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-4 aislado de <i>Atta cephalotes</i> , frente a bacterias Gram positivas y <i>Candida albicans</i>	53
Tabla 9. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 y HAA-4 frente a levaduras del género <i>Candida</i>	56
Tabla 10. Resultados estadísticos de la prueba ANOVA de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-16 frente a levaduras del género <i>Candida</i>	59

Tabla 11. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-16 frente a levaduras del género <i>Candida</i>)	60
Tabla 12. Intervalos generales de confianza al 95 % (Extractos orgánicos de la cepa HAA-16 frente a levaduras del género <i>Candida</i>).	61
Tabla 13. Resultados estadísticos de la prueba ANOVA de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-17 frente a levaduras del género <i>Candida</i>	62
Tabla 14. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a levaduras del género <i>Candida</i>)	63
Tabla 15. Intervalos generales de confianza al 95 % (Extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a levaduras del género <i>Candida</i>)	64
Tabla 16. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-4 frente a bacterias y levaduras)	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Acromyrmex</i> y <i>Atta</i> .	5
Figura 2. Mutualismo entre la Tribu Attini, <i>Streptomyces</i> y el hongo <i>Leucocoprinus</i>	6
Figura 3. Nido subterráneo de <i>Atta cephalotes</i> cuya parte externa se destaca como un montículo de tierra suelta	8
Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de una colonia de <i>Streptomyces coelicolor</i> mostrando largas cadenas de esporas	10
Figura 5. Clasificación del Phylum Actinobacteria, el cual comprende 63 géneros dentro del Orden Actinomycetales	11
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	15
Figura 7. Punto de muestreo de las hormigas, ubicado en el distrito Mariano Dámaso Beraún-Huánuco, Perú	26
Figura 8. <i>Atta cephalotes</i> (Linnaeus, 1758). A. Morfología general en vista lateral B. Vista frontal. C. Vista dorsal	35
Figura 9. Actinomiceto HAA-4 en el medio agar extracto de malta – levadura A. Morfología macroscópica del micelio aéreo. B. Morfología macroscópica del micelio vegetativo. C. Tinción Gram D. Tinción con azul de Lactofenol	37
Figura 10. Actividad amilolítica de las cepas HAA-1, HAA-6 y HAA-13. Tinción con el colorante Lugol para revelar tal actividad	39
Figura 11. Hidrólisis de la gelatina por las cepas HAA-18, HAA-21, HAA-25. Revelado con bicloruro de mercurio	40

Figura 12. Producción de caseinasas por las cepas HAA-7, HAA-9 y HAA-21	40
Figura 13. Actividad lipolítica de las cepas HAA-3, HAA-6 y HAA-11 provocada por las tween esterasas	41
Figura 14. Actividad inhibitoria mediante el bioensayo “doble capa” por parte del actinomiceto HAA-4 frente a <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	43
Figura 15. Actividad antifúngica de los actinomicetos aislados de <i>Atta cephalotes</i> frente a levaduras del género <i>Candida</i>	45
Figura 16. Frecuencia de la actividad antifúngica de las 30 cepas de actinomicetos frente a las levaduras del género <i>Candida</i>	47
Figura 17. Actividad antifúngica por el método “doble capa” de los actinomicetos asignados como HAA-17 (A) y HAA-16 (B) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	47
Figura 18. Actividad inhibitoria del actinomiceto HAA-1 frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 7516 en agar almidón sabouraud dextrosa	48
Figura 19. Número de actinomicetos aislados de <i>Atta cephalotes</i> y su actividad antimicrobiana	48
Figura 20. Agrupaciones filamentosas o “pellets” del actinomiceto HAA-17 en un matraz de caldo peptona- extracto de levadura con agitación de 200 rpm a 30°C	49
Figura 21. Actividad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos por fermentación de las cepas HAA-4, HAA-16, HAA-17 frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50
Figura 22. Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo frente a <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 7307	53

Figura 23. Actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	54
Figura 24. Actividad antifúngica de los extractos de diclorometano frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 98028	54
Figura 25. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de la cepa HAA-4 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	55
Figura 26. Prueba de CMI de los extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a <i>C. parapsilosis</i> ATCC 7307, usando cloruro de trifetil tetrazolium (TTC)	56
Figura 27. Árbol filogenético de las secuencias de ADNr 16S de las cepas de actinomicetos HAA-4, HAA-16 y HAA-17	58
Figura 28. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-16 comparados con el Control positivo (Fluconazol) frente a las levaduras del género <i>Candida</i>	61
Figura 29. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de HAA-17 comparados con el Control positivo (Fluconazol) frente a candidas	64

RESUMEN

El incremento de resistencia de los microorganismos patógenos hacia los antibióticos es una seria amenaza en la Salud Pública lo que crea la imperiosa necesidad de identificar nuevos antimicrobianos procedentes de ambientes antes no explorados. El objetivo principal del presente trabajo fue aislar, caracterizar y determinar la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas frente a bacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 51922) y levaduras (*Candida albicans* ATCC 98028, *C.albicans* ATCC 7516, *C.albicans* ATCC 10231, *C.tropicalis* ATCC 7206, *C.parapsilosis* ATCC 7307). Se aislaron 30 actinomicetos, en su mayoría caracterizadas fenotípicamente como *Streptomyces* sp. Los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 presentaron porcentajes de inhibición significativos (87% y 86% respectivamente) frente a *C. albicans* ATCC 10231. Asimismo, el actinomiceto HAA-4 presentó actividad inhibitoria de amplio espectro frente a bacterias (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 51922) y la levadura (*C. albicans* ATCC 7516). Los extractos orgánicos de la cepa HAA-17 obtenidos con acetato de etilo y diclorometano presentaron la mayor actividad antifúngica frente a las levaduras del género *Candida*. Asimismo, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de acetato de etilo de HAA-17 fue de 3,25 mg/mL frente a *C. albicans* ATCC 7516 y *C. parapsilosis* ATCC 7307. El análisis de la región parcial ADNr 16S reveló la presencia de cepas pertenecientes al género *Streptomyces*. En conclusión, los actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* son excelentes productores de compuestos bioactivos capaces de inhibir microorganismos patógenos de importancia clínica, confirmando su potencialidad de producir compuestos bioactivos de interés biotecnológico.

Palabras claves: productos naturales, actinobacterias, *Atta*, antagonismo, *Streptomyces*, bioactivos

ABSTRACT

The increasing of resistance from pathogenic microorganisms against antibiotics is a serious risk to public health, which creates the neediness to identify new antimicrobians from environments unexplored. The principal objective of this study was to isolate, characterize and determine the antimicrobial capacity of actinomycetes associated to leaf-cutter ants against bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 51922) and the yeast (*Candida albicans* ATCC 98028, *C.albicans* ATCC 7516, *C.albicans* ATCC 10231, *C.tropicalis* ATCC 7206, *C.parapsilosis* ATCC 7307). 30 actinomycetes strains were isolated, most of them characterized phenotypically as *Streptomyces* sp. Actinomycetes HAA-16 and HAA-17 presented significant inhibition percentages (87% and 86% respectively) against *C. albicans* ATCC 10231. Likewise, the actinomycete HAA-4 showed a wide spectrum inhibition activity against bacteria (*S. aureus* ATCC 25923 and *E.faecalis* ATCC 51922) and yeasts (*C. albicans* ATCC 7516). Organic extracts of the HAA-17 strain obtained with ethyl acetate and dichloromethane showed the highest antifungal activity against yeasts of the genus *Candida*. Likewise, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the ethyl acetate extract of HAA-17 was 3.25mg/mL against *C. albicans* ATCC 7516 and *C. parapsilosis* ATCC 7307. The analysis of the 16S rDNA partial region revealed the presence of strains belonging to the genus *Streptomyces*. In conclusion, the actinomycetes associated to leaf-cutter ants are excellent producers of bioactive compounds that can inhibit pathogenic microorganisms of clinical importance, confirming their potential to produce bioactive compounds of biotechnological interest.

Keywords: natural products, actinobacteria, *Atta*, antagonism, *Streptomyces*, bioactive

1. INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini son exclusivas del continente americano y particularmente de la Región Neotropical. Se encuentran ampliamente distribuidas en casi todo el territorio, desde el Sur de Norteamérica hasta la Patagonia, ocupando una gran variedad de ambientes (selvas, pastizales, bosques, estepas) (Folgarait & Farji-Brener 2005). Se caracterizan por presentar una simbiosis mutualista con hongos basidiomicetos (Agaricales: Lepiotaceae: Leucocoprineae), los cuales se benefician de la asociación ya que son propagados vegetativamente y cultivados por estas hormigas como alimento en cámaras especializadas de sus nidos (Hölldobler & Wilson 2009).

Las hormigas cortadoras están amenazadas por patógenos fúngicos especializados, principalmente por el hongo *Escovopsis* sp. (Ascomycota: Hypocreales anamórfico) el cual demostró tener efectos perjudiciales sobre los jardines del hongo simbiótico y, en consecuencia, en la supervivencia de la colonia de hormigas (Seifert *et al.* 1995, Currie *et al.* 1999b). Es así que durante más de diez años se han llevado a cabo diversas investigaciones que demuestran que las hormigas obreras defienden sus colonias de los hongos perjudiciales, a través de una combinación de mecanismos químicos y de comportamiento. Los mecanismos de comportamiento incluyen tareas específicas para cada casta dentro de la colonia de hormigas; la eliminación del hongo parásito se lleva a cabo por parte de las obreras menores que lamen las superficies del jardín y recogen las esporas en el bolsillo infrabucal, formando pellets que luego depositan en cámaras especializadas de desechos dentro del nido (Gerstner *et al.* 2011). Entre los mecanismos químicos se encuentran las secreciones de agentes antimicrobianos y antifúngicos de las glándulas metapleurales de hormigas y además los compuestos antimicrobianos producidos por actinomicetos presentes en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas (Fernandez-Marin *et al.* 2006, Haeder *et al.* 2009).

Los actinomicetos son un numeroso grupo de microorganismos aerobios cosmopolitas, presentes en lagos, ríos, suelo y estiércol de animales. Se ubican en la superficie del suelo y son considerados como la fuente más común de producción de antibióticos, antifúngicos y antitumorales (Okami *et al.* 1976). Los actinomicetos simbióticos son predominantemente de los géneros *Streptomyces*, *Pseudonocardia* y *Amycolatopsis*. Estas bacterias se alojan en la cutícula de las hormigas, algunas veces en mayor concentración en la propleura, y producen potentes sustancias antibióticas inhibidoras de diversos microorganismos patógenos, tales como *Escovopsis* sp. (Ascomycota: Hypocreales anamórfico) (Hölldobler & Wilson 2010, Seipke *et al.* 2011, Yek *et al.* 2013). Los actinomicetos del género *Streptomyces* son ampliamente reconocidos por su potencial biotecnológico, siendo los responsables de la producción de los dos tercios del total de las moléculas microbianas actualmente comercializadas (Currie *et al.* 1999a); consideradas también como la fuente natural más importante de sustancias con diferentes actividades biológicas como antibióticos (Sanz 2005).

Todo antibiótico que se introduce en clínica al cabo de cierto tiempo será inofensivo para los microorganismos que está inhibiendo, ya que su uso continuo dará lugar a la selección de aquellas bacterias que poseen algún tipo de mecanismo de resistencia. La resistencia se desarrolla frente a todas las clases de antibióticos, ya sean naturales o sintéticos, en el curso de un año a una década o desde su primer uso clínico (Walsh 2003). Es sabido que el incremento de la resistencia de los patógenos hacia los antibióticos es una seria amenaza en la Salud Pública; esto crea la imperiosa necesidad de identificar nuevos antimicrobianos o de diseñar inhibidores de enzimas que confieran resistencia a antibióticos (Huang *et al.* 2003). Hoy en día, el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y de otros metabolitos secundarios bioactivos requiere la búsqueda de nuevas especies o géneros de microorganismos en ambientes no explorados (Busti *et al.* 2006). Los estudios referidos a la producción antibiótica por *Streptomyces* comenzaron alrededor de 1940 y continúan en la actualidad, debido

principalmente a la necesidad de encontrar nuevos fármacos eficaces contra bacterias multidrogoresistentes (MDR) (Waksman & Woodruff 1941).

Esta investigación busca determinar la capacidad antagonista de actinomicetos presentes en hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini), las cuales forman parte de la mirmecofauna de la Provincia de Leoncio Prado - Huánuco; frente a bacterias y levaduras patógenas de importancia clínica, las cuales forman parte de la colección de cepas referenciales pertenecientes al Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los resultados servirán como base para futuros estudios, donde se intente extraer e identificar el principio activo del actinomiceto con mayor espectro de acción; además satisfacer la creciente demanda de nuevos principios activos, estudios que permitirán entender el mecanismo de acción y mejorar la acción en la lucha contra infecciones causadas por microorganismos patógenos.

Es por ello, que el presente estudio considera que los actinomicetos contribuirán en la producción de nuevos metabolitos antibacterianos que pueden controlar la resistencia microbiana; evidenciando así su gran importancia para la Salud Pública.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Hormigas cortadoras de hojas

Las hormigas se destacan dentro del importante grupo taxonómico de los insectos por su alta diversidad, dominancia numérica e importancia ecológica, constituyendo el 20% de toda de la biomasa animal (Vittar 2008). Actualmente se reconocen alrededor de 11,500 especies de hormigas, descritas en todo el mundo, de las cuales el 30% corresponden a la Región Neotropical y a pesar que esta región es un centro de riqueza de hormigas y endemismo, la fauna de hormigas de muchos países neotropicales, incluyendo Perú, ha sido poco estudiada (Alonso 2010, Fernández & Sendoya 2004).

La tribu Attini, perteneciente a la subfamilia Myrmicinae, es endémica del Neotrópico y es uno de los grupos con mayor dispersión geográfica, adaptabilidad y éxito evolutivo, especialmente en Sudamérica, Centroamérica y en el sur de Estados Unidos (Currie *et al.* 1999a, Fernández *et al.* 2015, Schultz 1999). Attini comprende 16 géneros y aproximadamente 256 especies, siendo los géneros *Acromyrmex* y *Atta* los que evolucionaron hace 8-12 millones de años; estos géneros son conocidos como hormigas cortadoras de hojas y se caracterizan por poseer grandes colonias de hasta varios millones de individuos (Fernández *et al.* 2015). Las diferencias entre los dos géneros son fáciles de distinguir; el género *Atta* presenta por lo menos 2 pares de espinas pronotales, no presenta tubérculos en la cabeza, el gáster no presenta tubérculos y es moderadamente liso, y sus nidos generalmente están constituidos por montículos de tierra suelta, mientras que el género *Acromyrmex* presenta 4 pares de espinas bien desarrolladas en el tórax, presenta varios tubérculos en la cabeza y sus nidos generalmente no presentan montículo. El carácter más importante es que *Acromyrmex* tiene muchos tubérculos en el gáster lo cual nunca ocurre en *Atta* (**Figura 1**) (Fowler *et al.* 1993).

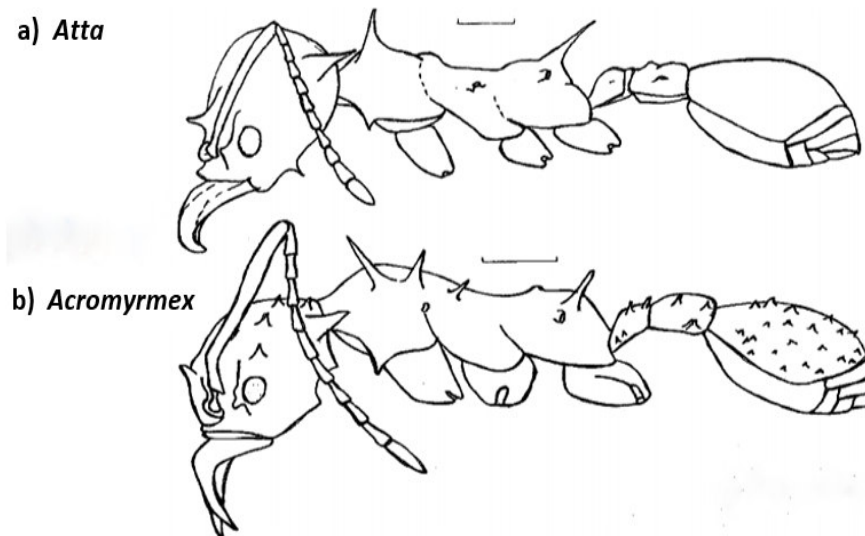


Figura 1. Morfología de *Acromyrmex* y *Atta*. Tomado de Anglada *et al.* 2013.

Las hormigas cortadoras de hojas presentan una simbiosis mutualista con hongos basidiomicetos, los cuales se benefician de la asociación porque son propagados vegetativamente y cultivados por estas hormigas como fuente de alimento para sus crías, por lo cual a las Attinas también se les conoce como hormigas cultivadoras de hongos (Hölldobler & Wilson 2010, Kanno 1972, Keller & Gordon 2010). La gran mayoría de estos hongos, pertenecen a los géneros *Leucoagaricus* y *Leucocoprinus*, que pertenecen a la tribu Leucocoprineae de la familia Lepiotaceae (Basidiomycota: Agaricales) (Vo *et al.* 2009). La relación ectosimbiótica obligada entre las hormigas y el hongo permite que las plantas que no pueden ser utilizadas directamente como alimento de las arrieras por su efecto insecticida o fago-inhibidor, sí pueden ser aprovechadas como nutrientes del hongo, el cual posee mecanismos para combatir estos compuestos antialimentarios naturales de las plantas. Las larvas de las cortadoras son alimentadas con el hongo que cultivan sus hermanas adultas. En su saliva, las hormigas poseen quitinasas, las cuales consisten en enzimas utilizadas para la degradación de la pared celular de los gongilidios. Estos a su vez son estructuras especializadas que el hongo simbiote expone al consumo de las Attini y que consisten

en células hifales ensanchadas (Serna & Correa 2003). En esta simbiosis también participan varios organismos, entre los que se encuentran bacterias filamentosas de actinomicetos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudonocardia* y *Amycolatopsis*; entre otras bacterias presumiblemente provenientes del suelo, las que también participan en la interacción multitrófica (Hölldobler & Wilson 2010, Seipke *et al.* 2011, Yek *et al.* 2013). Estas bacterias se alojan en la cutícula de las cultivadoras, algunas veces con mayor concentración en la propleura, y producen potentes sustancias antibióticas inhibitoras del crecimiento de *Escovopsis* sp; un hongo parásito que invade los jardines del hongo cultivado por Attini (**Figura 2**) (Ariniello 1999, Gerstner *et al.* 2011, Hölldobler & Wilson 2010). Además, existen otros dos microorganismos que se encuentran involucrados en la ecología de la simbiosis: a) una levadura negra que se adhiere a la cutícula de las cultivadoras, se alimenta de *Pseudonocardia* y afecta negativamente su eficiencia antibiótica; y b) bacterias fijadoras de nitrógeno, probablemente del género *Klebsiella*, que facilitan el cultivo del hongo simbiote. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran comúnmente en vegetales del orden Fabales (Hölldobler & Wilson 2010, Seipke *et al.* 2011).

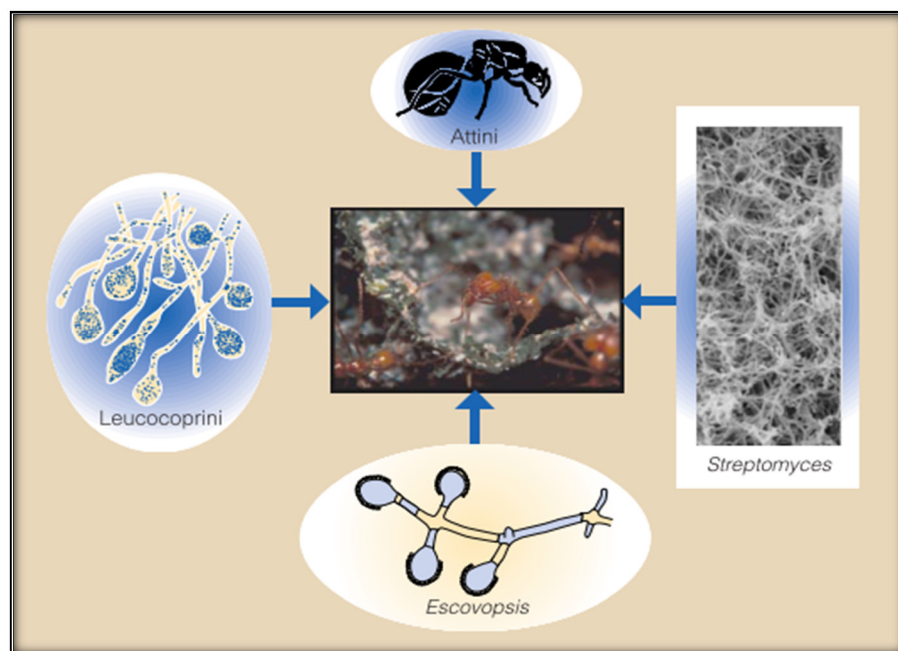


Figura 2. Mutualismo entre la Tribu Attini, *Streptomyces* y el hongo *Leucocoprinus*.

Streptomyces produce antibióticos contra *Escovopsis* sp. Tomado de Schultz 1999.

La protección por parte de las hormigas cortadoras de hojas es crucial cuando los patógenos microbianos los invaden, lo que explica que produzcan compuestos con propiedades antibióticas (Poulsen *et al.* 2002). La mayoría de las especies de hormigas anidan en el suelo, es decir, en un hábitat adecuado para que los microorganismos de vida libre puedan causar infecciones a la colonia. Estudios experimentales han demostrado que el control de infecciones es una función primaria de las glándulas exocrinas metapleurales, únicas en las hormigas; estas son un par de estructuras ubicadas en el extremo posterolateral del tórax de las hormigas, que sintetizan una serie de compuestos antibacterianos y antifúngicos (Bot *et al.* 2002, Fernandez-Marin *et al.* 2006, Gerstner *et al.* 2011). Las secreciones de las glándulas metapleurales se extienden por la cutícula de las hormigas y son transferidas entre ellas para combatir y prevenir el desarrollo y la propagación de enfermedades dentro de la colonia. Las secreciones de las glándulas de las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* están constituidas por compuestos químicos tales como geraniol, ácidos fenilacético e indolacético (De Lima *et al.* 2009). Es así que tanto las secreciones de las glándulas metapleurales como los actinomicetos, están presentes en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas; en consecuencia, se ha investigado su interacción, encontrando que dichas secreciones controlan el crecimiento de los simbiontes microbianos sobre los cuerpos de las hormigas (Currie *et al.* 2006).

2.2. El género *Atta*

Las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* se caracterizan por presentar dos pares de espinas o protuberancias (en algunas especies) pronotales y un par sobre el propodeo. El opistogáster no presenta tubérculos y es moderadamente liso y brillante a comparación del género *Acromyrmex* que sí posee tubérculos. Las mandíbulas son grandes, sus antenas presentan 11 segmentos (un escapo y funículo de 10 segmentos) (Fernández *et al.* 2015).

Uno de los efectos notables causados por la colonización de *Atta* es la aparición de nidos u hormigueros que se distinguen por la presencia de montículos de tierra suelta (**Figura 3**), producto de excavaciones en el suelo para construir subterráneamente el nido; además su alto grado de polimorfismo facilita el cumplimiento de las labores dentro de la colonia, de acuerdo con sus tamaños y comportamientos (Moreira *et al.* 2004, Moser 2006). De esta manera, en una colonia de cortadoras se presenta 3 grupos de especímenes: la reina, obreras y zánganos. La casta obrera a su vez, presenta subcastas caracterizadas por especímenes de diferentes tamaños: a) soldados u obreras mayores, las cuales poseen mandíbulas fuertes y son las encargadas de proteger la colonia; b) cortadoras y obreras menores, las que transportan el material vegetal y c) nodrizas y jardineras, las que presentan el menor tamaño dentro de la casta y se encargan del cuidado de las crías y el cultivo del hongo simbionte respectivamente (Giraldo *et al.* 2008). En Perú se encuentran 15 especies de hormigas cortadoras de hojas de las cuales tres corresponden al género *Atta* (*Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758), *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) y *Atta vollenweideri* (Forel, 1893) (Bezděčková *et al.* 2015).



Figura 3. Nido subterráneo de *Atta cephalotes* cuya parte externa se destaca como un montículo de tierra (Distrito Mariano Dámaso Beraún – Huánuco, Perú 2015).

Fuente: Autora

2.3. Actinomicetos

2.3.1. El Phylum Actinobacteria

El Phylum Actinobacteria es un grupo de bacterias de distribución mundial y muy abundantes en suelos, sobre o dentro de los animales, ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos y en prácticamente cualquier superficie natural. Son bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina en su ADN, que van desde 51% en algunas bacterias del género *Corynebacterium* e incluso más de 70% en especies de *Streptomyces* y *Frankia* (Ventura *et al.* 2007).

Las Actinobacterias desarrollan filamentos durante su crecimiento los cuales se ramifican y producen micelios que pueden ser de dos tipos: micelio vegetativo y micelio aéreo. En los extremos de los filamentos se forman esporas reproductivas asexuales; si estas esporas llegan a un sustrato adecuado, pueden formar nuevas colonias (**Figura 4**) (Hwang *et al.* 2014). Estas estructuras son resistentes tanto a la temperatura como a otras condiciones adversas, característica que les permite persistir en ambientes que muestran condiciones de estrés abiótico (Kieser *et al.* 2000). Una característica particular es el olor a humedad que es producido por la geosmina, una sustancia producida por algunas especies de este grupo de bacterias (Ezziyyani *et al.* 2004, González *et al.* 2005). Las Actinobacterias son microorganismos capaces de utilizar diferentes sustratos, presentar varias rutas metabólicas y poseer la capacidad de producir y degradar compuestos orgánicos e inorgánicos, favoreciendo la formación de humus y enriquecimiento mineral del suelo (Leveau & Bouix 2000, Oskay *et al.* 2005). Un ejemplo lo constituye la gama de enzimas extracelulares producidas por Actinobacterias. Se han realizado una vasta cantidad de estudios en biotecnología basados en la obtención y purificación de enzimas de interés industrial mediante la fermentación de cepas de este grupo microbiano (El-Shahed *et al.* 2008, Narayana & Vijayalakshmi 2009).

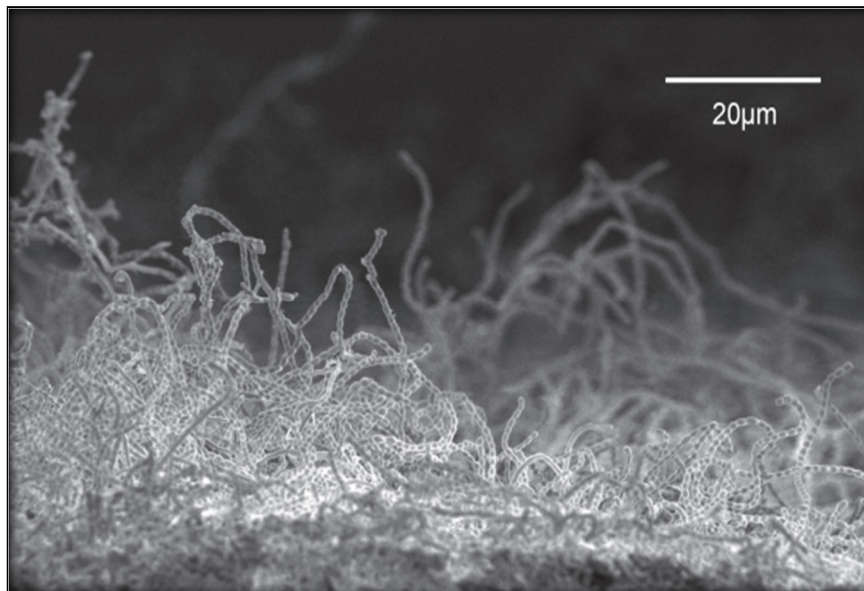


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de una colonia de *Streptomyces coelicolor* (Waksman y Henrici,1943) mostrando largas cadenas de esporas. Tomado de Elliot *et al.* 2008.

Además de las propiedades morfológicas, macro y microscópicas de los actinomicetos, los criterios para su clasificación están basados en la quimiotaxonomía que establece cuatro tipos principales de pared celular bacteriana: según la composición y estructura del peptidoglicano, presencia de azúcares, isómeros del ácido diaminopimérico y presencia de glicina en los puentes interpeptídicos. Asimismo, la quimiotaxonomía incluye el patrón de ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana; las menaquinonas y su grado de hidrogenación, tipos de ácidos micólicos y el porcentaje molar de la relación guanina-citosina del ADN (Franco-Correa 2008). A pesar de ello, la aplicación de técnicas moleculares al análisis de los genomas de los actinomicetos, y en general de las bacterias, ha contribuido extensamente con su clasificación taxonómica (**Figura 5**). El Phylum Actinobacteria es conocido también por las sustancias químicas que son capaces de producir algunas de sus especies, las cuales han sido explotadas por las industrias farmacéuticas para la producción de medicamentos. Los estudios de producción de antibióticos por parte de las Actinobacterias datan desde los años 40; por ejemplo, de los 12,000 antibióticos caracterizados hasta el año de 1995, el 55% fueron producidos por actinomicetos del género *Streptomyces*, el 11% por otros actinomicetos,

12% por bacterias no filamentosas y el 22% restante por hongos filamentosos (Sanz 2005). La producción de antibióticos por Actinobacterias está ligada al fenómeno ecológico de antagonismo bacteriano, en el que la producción de sustancias inhibitorias por un microorganismo a condiciones específicas puede reducir o limitar el crecimiento de otra población, generando variaciones en la estructura de comunidades microbianas (Franco-Correa 2008).

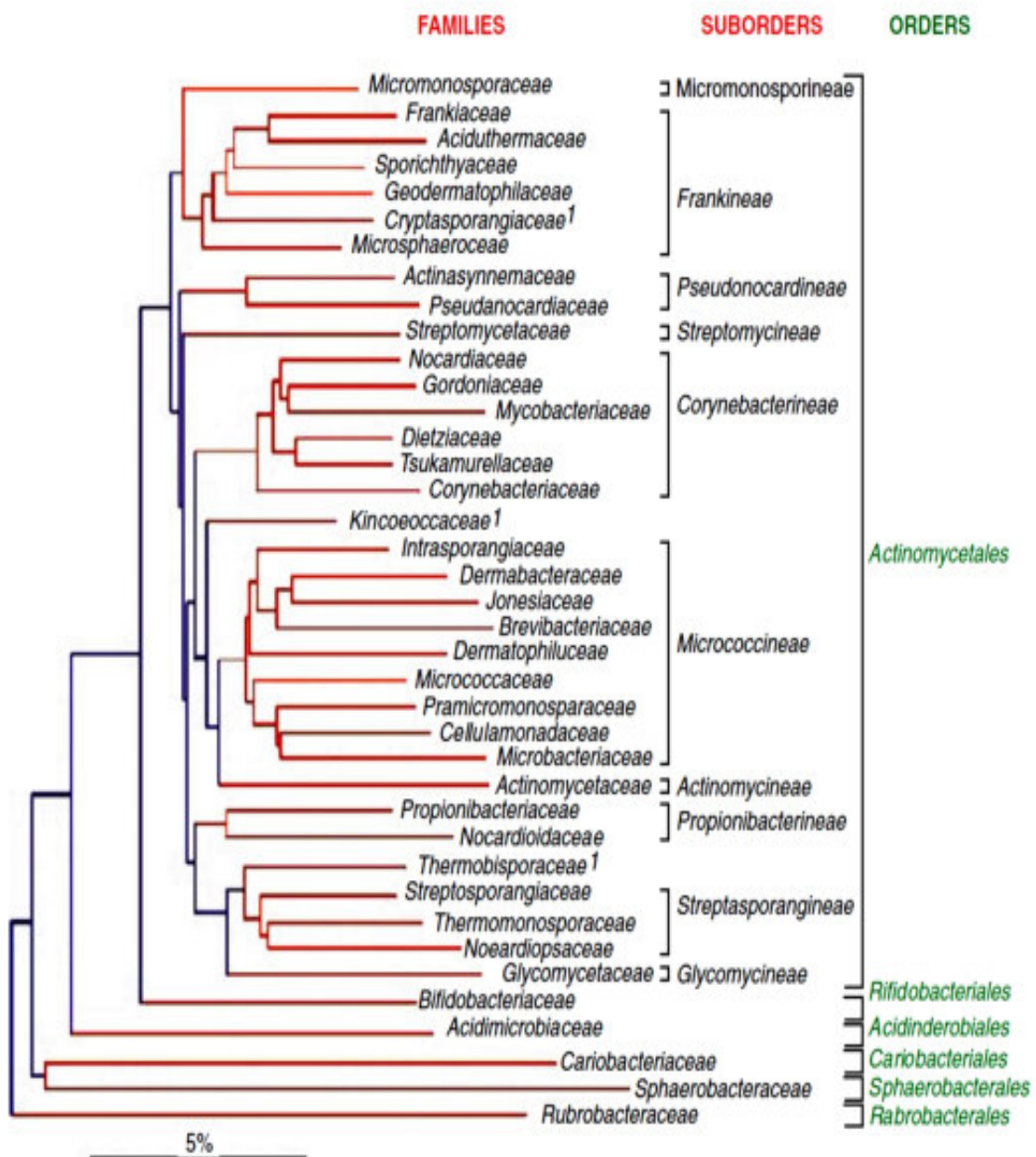


Figura 5. Clasificación del Phylum Actinobacteria, el cual comprende 63 géneros dentro del Orden Actinomycetales. Tomado de Prescott 2002.

2.3.2. El género *Streptomyces*

PHYLLUM: Actinobacteria

CLASE: Actinobacteria

SUBCLASE: Actinobacteridae

ORDEN: Actinomycetales Buchanan, 1917

SUBORDEN: Streptomycineae Rainey, 1997

FAMILIA: Streptomycetaceae Waksman, 1943

Género: *Streptomyces* Waksman, 1943

2.3.2.1. Generalidades

Streptomyces engloba alrededor de 500 especies descritas, las cuales se caracterizan por ser bacterias aerobias estrictas, con alto contenido de G+C (69-78%). Los miembros de este género son llamados comúnmente estreptomicetos (del griego, streptos, doblados o torcidos; y myces, hongos), y a diferencia de la mayoría de las bacterias, poseen un cromosoma lineal de gran tamaño, superando en todos los casos los 8 Mb (Sanz 2005).

Las especies del género *Streptomyces* obedecen patrones fenotípicos y quimiotaxónomicos comunes como colonias secas o pulverulentas, las cuales tienden a formar un micelio de sustrato fuertemente adherido a la superficie, además de un micelio aéreo el cual contiene las esporas bacterianas. Pueden producir una amplia variedad de pigmentos responsables del color del sustrato y del micelio aéreo (León *et al.* 2007, Manteca & Sanchez 2010). Son quimiorganótrofos con un tipo de metabolismo oxidativo. Dentro de sus características particulares, presentan el olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito denominado geosmina (González *et al.* 2005). Generalmente reducen los nitratos a nitritos y degradan sustratos poliméricos tales como caseína, gelatina, hipoxantina y almidón. La mayoría de especies utilizan una

amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes únicas de carbono para proveerse de energía e incentivar su crecimiento (Ezziyyani *et al.* 2004).

La temperatura óptima para la mayoría de especies se encuentra en el intervalo de 25-35 °C; algunas especies, sin embargo, pueden crecer a temperaturas dentro de los rangos psicrófilos y termófilos (Selyanin *et al.* 2005). Por tanto, las placas de aislamiento por lo general se incuban a 22-37°C (Agarwal & Mathur 2016). Las cepas de *Streptomyces* crecen de manera óptima a valores de pH neutros, es decir, son organismos neutrófilos; en consecuencia, la mayoría de los medios de aislamiento tienen valores de pH entre 7 a 7,5 (Zakalyukina *et al.* 2002). Las especies se encuentran ampliamente distribuidas y son abundantes en el suelo, incluyendo el compost (Salazar *et al.* 2014).

La clasificación del género *Streptomyces* se inicia en 1964 con el Proyecto Internacional de *Streptomyces* (ISP) para introducir un criterio estándar en la determinación de especies de este género. Mediante la utilización de varias características fenotípicas se consiguió reducir la cantidad de especies de *Streptomyces* de 463 a 142 de la versión del Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey del año 1972 al año 1989. Hoy en día, para la clasificación de especies de *Streptomyces*, se deben utilizar métodos quimiotaxonómicos y moleculares, junto con los métodos basados en criterios fenotípicos (Anderson & Wellington 2001). Estos han sido ampliamente estudiados desde el punto de vista industrial y biotecnológico durante los últimos 50 años (Goriely & Tabor 2003). Más del 50% de los microorganismos productores de antibióticos registrados en la industria pertenecen únicamente a este género, desplazando a los hongos, algas y algunos otros géneros bacterianos (Kieser *et al.* 2000). El estudio de su pared celular también permitió clasificar a las bacterias de este género con la característica de presentar ácido diaminopimélico en la pared de péptidoglucano del micelio vegetativo, así como la presencia de azúcares como la glucosa (Franco-Correa 2008).

2.3.2.2. Ciclo de vida

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Estas bacterias son capaces de colonizar sustratos relativamente secos con restos de materia orgánica, formando una red de hifas tabicadas ramificadas que dan lugar al micelio sustrato. Estas hifas obtienen los nutrientes de la degradación del material orgánico insoluble gracias a numerosas enzimas hidrolíticas (Chater 2001). En una primera etapa, las zonas más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno), hasta que en un determinado momento y debido a la carencia de nutrientes, se reciben una serie de señales justamente en esta zona que disparan la expresión de genes implicados en la formación del micelio aéreo. Se produce así, el desarrollo de hifas que emergen del micelio sustrato para dar lugar al micelio aéreo. Estas hifas se van a nutrir de los productos de degradación del micelio sustrato, y en una segunda etapa van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y que, con las condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo micelio sustrato (**Figura 6**). Las cadenas de esporas son una característica morfológica y taxonómica importante, ya que, dependiendo de la especie, las formas de las cadenas, pueden ser rectas, ramificadas, en espiral o flexuosas (Shirling & Gottlieb 1966). Asimismo, se sabe que un número de diferentes genes están involucrados en la formación de esporas, y que las diferentes condiciones de cultivo pueden tener influencia en la formación de esporas (Goodfellow *et al.* 2012). La producción y secreción de metabolitos secundarios, por lo general, coincide con el inicio de la diferenciación morfológica una vez terminado el desarrollo vegetativo (Loria *et al.* 2006, Champness & Chater 1994).

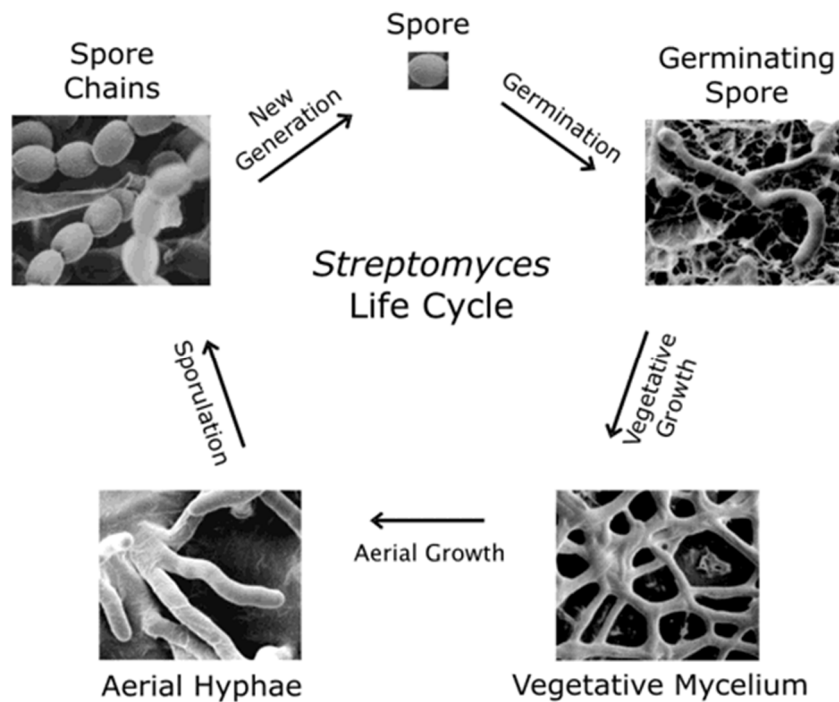


Figura 6. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Tomada de Champness & Chater 1994.

2.3.2.3. Metabolismo secundario en *Streptomyces*

Durante el ciclo biológico de *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo resultado es el mantenimiento de los procesos vitales de la célula (síntesis de ácidos grasos, proteínas, lípidos, polisacáridos, coenzimas, etc) y el incremento de la biomasa total. Estos procesos son esencialmente idénticos en todas las células. En cambio, en el metabolismo secundario se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor, al menos en las condiciones estudiadas. No obstante, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica (Evangelista & Moreno 2007). Los metabolitos secundarios poseen algunas características comunes entre las que se pueden resaltar las siguientes:

- La mayoría de los compuestos son específicos de la cepa productora.
- Presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas.

- En general son productos de complejas rutas biosintéticas.

La síntesis de los metabolitos secundarios se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria, y se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica en *Streptomyces* tal como se ha comentado previamente (Yepes 2010).

2.3.2.4. Producción de metabolitos secundarios por *Streptomyces*

Dentro del amplio y heterogéneo abanico de metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces*, tenemos compuestos que cubren diferentes necesidades en las áreas médica, agrícola y alimenticia (**Tabla 1**). Se estima que cerca de 23,000 metabolitos secundarios bioactivos son producidos por microorganismos, específicamente, más de 10,000 de ese tipo de compuestos son producidos por actinomicetos, mientras que alrededor de 7,600 compuestos son producidos por especies de *Streptomyces* y solo 150 se han usado en áreas como farmacología, agricultura, entre otras (Olano *et al.* 2008). Esto es importante debido a que hoy en día en la medicina se requiere de nuevos productos debido a:

- 1) El desarrollo de resistencia de microorganismos patógenos
- 2) La aparición de nuevas enfermedades (SIDA, virus Hanta, virus del Ébola, enfermedad de Lyme, *Escherichia coli* 0157:H7, entre otras)
- 3) La existencia de bacterias resistentes naturalmente y
- 4) La toxicidad de algunos compuestos actualmente en uso.

En la agricultura se requiere compuestos útiles para combatir bacterias, virus, insectos y nematodos fitopatógenos, y para la nutrición animal se requiere compuestos que puedan utilizarse en la preservación de alimentos (Evangelista & Moreno 2007).

Por tanto, dentro de las variedades de metabolitos secundarios destacan los antibióticos por sus extensas aplicaciones clínicas. Las bacterias de este género producen más del

50 % de los antibióticos naturales principalmente contra bacterias Gram positivas. Los antibióticos se definen como metabolitos de bajo peso molecular producidos principalmente por microorganismos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o causar la muerte de otros microorganismos a bajas concentraciones. Los genes cuyos productos intervienen en su biosíntesis están físicamente agrupados en clústers. El tamaño de éstos suele ser variable, extendiéndose desde 15 Kb hasta 100 Kb, y los genes implicados en resistencia, transporte y regulación también suelen incluirse en dichas agrupaciones génicas (Hesketh *et al.* 2009). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de compuestos aislados, surgió la necesidad de una revisión a fondo de los objetivos y los métodos para buscar compuestos útiles. En este sentido, la búsqueda de compuestos activos comenzó a dar un giro importante, principalmente teniendo como objetivo la búsqueda de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Evangelista & Moreno 2007).

Tabla 1. Nuevos metabolitos aislados de actinomicetos durante el periodo 2003 – 2005. Tomado de Lam 2006.

Compound	Source	Activity
Abyssomicins	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureovercillatus</i>	Anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialagi; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	<i>Novel actinomycete</i>	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonosproa</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancer
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Marinomycins	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; anticancer
Mechercharmucins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
MKN-349A	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Unknown biological activity
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

2.4. Principales patógenos de importancia clínica

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, la invención y desarrollo de nuevos productos naturales como fármacos, específicamente antibióticos, ha traído consigo grandes beneficios a la humanidad en términos de salud, veterinaria y agricultura. Sin embargo, el uso inadecuado e incontrolado de los antibióticos ha provocado la resistencia a éstos por diferentes microorganismos patógenos. Según la OMS, los casos de resistencia a antibióticos contra muchos patógenos bacterianos se han incrementado debido a la prescripción excesiva y al uso indebido de antibióticos (World Health Organization 2001). Hoy en día, las cepas patógenas multirresistentes emergen más rápidamente que la tasa de descubrimiento de antibióticos. Recientemente, se han descrito cepas resistentes que forman parte de la microbiota de la mayoría de pacientes de diversos nosocomios (Gordon & Lowy 2008). Entre los principales microorganismos de importancia clínica tenemos:

Staphylococcus aureus, es una bacteria Gram positiva causante de bacteriemia asociada a una alta morbilidad y mortalidad, representa cerca de 11% a 33% de las bacteriemias hospitalarias y un porcentaje importante de las adquiridas en la comunidad, con tasas de complicaciones cercanas al 50% (Tibazco *et al.* 2007). La carga de bacteriemia *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), en términos de costo y uso de recursos es alta. SARM se asocia tradicionalmente a infecciones nosocomiales o relacionadas con la asistencia sanitaria, esto es debido a la capacidad de *S. aureus* de infectar catéteres endovenosos y dispositivos protésicos intravasculares. En los hospitales la tasa de infección/colonización por SARM representa al 25% de los aislamientos de *S. aureus*. En combinación con la virulencia inherente del patógeno se está impulsando la necesidad de mejorar las estrategias y mejores antibióticos para prevenir y tratar la bacteriemia por *S. aureus* y sus complicaciones (Álvarez *et al.* 2010, Rojas *et al.* 2008).

Enterococcus faecalis, es una bacteria Gram positiva que puede causar diferentes tipos de infección, tales como las del tracto urinario, bacteriemias, endocarditis, meningitis, infecciones intraabdominales (bilíares o peritoneales) y de úlceras o isquémicas. Actualmente es considerada como una de las principales causas de las infecciones nosocomiales puesto que tiene la habilidad de adquirir resistencia a la mayoría de los antibióticos en uso. En la actualidad, presenta resistencia innata a cefalosporinas, aztreonam, cloxacilina, clindamicina y sulfametoxazol. La exposición a las cefalosporinas es un riesgo particularmente importante en la colonización e infección con enterococos, entre la más importante una variedad de *Enterococcus* que son resistentes a Vancomicina (ERV) (Girón & Pérez 2003).

Bacillus subtilis, es una bacteria Gram positiva y si bien no es considerada como un patógeno humano, puede contaminar los alimentos y causar en ocasiones intoxicación alimenticia. Aunque existe variación en los patrones de resistencia frente a los antimicrobianos entre las diferentes especies del género *Bacillus*, se consideran generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación (Faría *et al.* 2001).

Escherichia coli, es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos, ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran tejidos humanos y órganos y es responsable de producir más del 80 % de las infecciones del aparato urinario, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales. Las bacteriemias por *E. coli* con Betalactamasa de espectro extendido (BLEE) constituyen una entidad clínica grave que, al igual que en otras infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, suponen un reto a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico correcto que no favorezca el desarrollo de resistencias por otros mecanismos (García-Hernández *et al.* 2011).

Klebsiella pneumoniae, es una bacteria Gram negativa que está asociada a altas tasas de morbilidad y mortalidad en las infecciones nosocomiales. Es la causante principalmente de infecciones del torrente sanguíneo, neumonía, infección urinaria, herida quirúrgica, enterocolitis, meningitis, conjuntivitis, absceso renal y endocarditis. Está considerada como el segundo agente causal, luego de *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas (Koneman & Allen 2008, Reimer *et al.* 1997).

Género *Candida*

Las levaduras del género *Candida* son comensales humanos muy ubicuos, que pueden causar infección oportunista en cualquier localización del organismo. Existen más de 150 especies de *Candida*, donde 17 de ellas se consideran patógenas habituales para el ser humano, pero sólo 5 producen más del 90% de las infecciones invasivas, éstas son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Otras menos frecuentes son: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. dubiniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides* y *C. pelliculosa*. La virulencia y patogenicidad de algunas de estas especies han mostrado un aumento importante en la mortalidad, además de implicar un reto terapéutico ante el aumento de resistencia a los tratamientos usados (Nuri & Yasemin 2011, Pemán & Cantón 2005, Pfaller & Diekema 2007).

Candida albicans, es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre 90 a 100% de las cepas aisladas de las mucosas, y entre un 50-70 % de pacientes con infecciones septicémicas. *C. albicans* es la más frecuente en las candidemias, sin embargo, debido al uso indiscriminado de antibióticos y azoles, el aislamiento de *Candida* es cada vez más común (Pemán & Cantón 2005, Pfaller & Diekema 2007).

Candida tropicalis, es una de las principales causas de septicemia y candidiasis diseminada, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes. Es el segundo patógeno más frecuentemente encontrado próximo a *C. albicans*, y se encuentra formando parte de la flora normal mucocutánea (Bonifaz & Alexandro 2012). *C. tropicalis* fue inicialmente catalogada como susceptible a Fluconazol y Anfotericina B, sin embargo, reportes en los últimos cinco años indican un rápido desarrollo de resistencia a estos agentes (Bonifaz & Alexandro 2012, Nuri & Yasemin 2011, Pemán & Cantón 2005).

Candida parapsilosis, esta especie ha emergido como un patógeno importante de candidemia, además de estar asociado de manera creciente a un amplio espectro de infecciones. En el entorno clínico esta levadura oportunista se ha asociado con las manos de trabajadores del área de salud, y es particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes cateterizados, además de pacientes bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa (Trofa *et al.* 2008). Su amplio patrón de distribución en la naturaleza, su creciente incidencia en varias partes del mundo, su alta frecuencia de resistencia a las equinocandinas, además de la escasa información con la que se cuenta hasta el momento dejan en claro que *C. parapsilosis* es un importante patógeno oportunista, representando una amenaza desafiante (Rogelio *et al.* 2012).

Las circunstancias actuales en Salud Pública exigen descubrir, obtener y caracterizar nuevos y potentes compuestos antimicrobianos que enfrenten a los microorganismos resistentes (Olano *et al.* 2014). Los científicos y muchas industrias farmacéuticas tratan de realizar programas de detección de nuevos actinomicetos procedentes de ambientes intactos como el agua marina o asociados a otros organismos (Moncheva *et al.* 2002). Es así que los nuevos actinomicetos deben ser la mejor opción para la búsqueda de sustancias bioactivas efectivas contra patógenos resistentes. Cabe hacer mención que

avances en biotecnología e ingeniería genética ofrecen la posibilidad de incrementar la expresión de genes y así aumentar la producción de metabolitos secundarios con interés biotecnológico (Tanaka *et al.* 2013).

2.5. Antecedentes

En el Perú, el campo de investigación de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas con potencial antimicrobiano aún es muy escaso, encontrándose pocos estudios registrados en la literatura enfocados en el antagonismo frente a bacterias y hongos y levaduras. Uno de los primeros aportes lo proporcionan Horna & Sialer (2003), quienes aislaron 240 cepas de *Streptomyces* sp. de las cutículas de hormigas pertenecientes a la especie *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793), de las cuales 60 cepas fueron evaluadas para probar *in vitro* la actividad antifúngica contra los dermatofitos *Microsporum cannis* (Bodin, 1945), *Trichophyton rubrum* (Malmsten, 1845) y *Trichophyton mentagrophytes* (Sabour, 1895). Los resultados mostraron inhibición contra *M. cannis* en un 68,33 %; un 46,67 % contra *T. rubrum* y un 40 % contra *T. mentagrophytes*; además, se observó efectividad de algunas cepas contra dos dermatofitos en un 25% y contra los tres en un 23,33%. Sus estudios demuestran que los actinomicetos son una buena fuente para la obtención de nuevas sustancias antifúngicas altamente efectivas y que algunas producen sustancias con actividad antifúngica específica y otras de amplio espectro.

Otro de los aportes importantes lo brindan Sialer *et al.* (2008), quienes consiguieron aislar 197 microorganismos asociados a hormigas cortadoras de hojas de cuatro diferentes nidos pertenecientes a la especie *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793); y además obtuvieron extractos purificados por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), los cuales fueron probados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp, *Enterococcus faecalis*, y bioensayos contra líneas

tumorales H729 (carcinoma de colon), A549 (adenocarcinoma pulmonar) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama); obteniendo un abanico de compuestos biocidas producidos por las cepas aisladas.

Por tanto, esta investigación tiene como objetivo central evaluar la capacidad antagonista de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas frente a bacterias y levaduras patógenas de humanos. Los resultados servirán como base para futuros estudios, donde se intente extraer e identificar el principio activo del actinomiceto con mayor espectro de acción para satisfacer la creciente demanda de nuevos principios activos que permitan mejorar su acción en la lucha contra infecciones y la resistencia microbiana; evidenciando así su gran importancia para la Salud Pública.

3. HIPOTESIS

3.1. Hipótesis de la Investigación

Los actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias y levaduras de importancia en Salud Pública.

3.2. Hipótesis nula

Los actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas no son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias y levaduras de importancia en Salud Pública.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar y determinar la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas frente a bacterias y levaduras de importancia clínica.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar taxonómicamente las especies de hormigas cortadoras de hojas, fuente de aislamiento de los actinomicetos.
2. Aislar mediante metodologías convencionales cepas de actinomicetos a partir de hormigas cortadoras de hojas recolectadas en la Selva Central (Huánuco, Perú).
3. Caracterizar fenotípicamente los actinomicetos aislados de acuerdo a su comportamiento cultural, morfológico y bioquímico.
4. Evaluar la capacidad antagonista de los actinomicetos aislados contra bacterias y levaduras de importancia médica.
5. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos de actinomicetos seleccionados frente a patógenos.
6. Identificar los actinomicetos de mayor actividad antimicrobiana mediante técnicas moleculares.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

- Actinomicetos aislados de hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini) colectadas en el distrito Mariano Dámaso Beraún – Huánuco, Perú.
- Bacterias y levaduras patógenas de referencia American Type Culture Collection (ATCC), los cuales presentan características típicas, estables y son reproducibles: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 51922, *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 7516, *Candida albicans* ATCC 98028, *Candida tropicalis* ATCC 7206, *Candida parapsilosis* ATCC 7307.

5.2. Metodología

5.2.1. Recolección de hormigas cortadoras de hojas

La colecta de las hormigas fue realizada en las áreas verdes del distrito Mariano Dámaso Beraún ubicado en la Provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, durante el mes de enero del 2015. Estas áreas se encuentran en el camino hacia las cataratas Santa Carmen en las coordenadas: 9°21'22" latitud sur y 75°58'27" longitud oeste) (**Figura 7**). El departamento de Huánuco perteneciente a la Yunga Tropical fue elegido para la colecta puesto que presenta un clima cálido con temperaturas promedios de 18°C a 29°C y una humedad relativa anual de 80%, características del hábitat de las hormigas quienes tienen una excelente adaptación a climas cálidos y humedad alta, constituyendo así la décima parte de la biomasa animal total de la Selva Tropical (Harris & Hutchison 2011). Se realizó un único muestreo en la entrada y los alrededores de un hormiguero en donde predomina la vegetación de tipo arbustiva y donde además

el sustrato es básicamente tierra húmeda cubierta por ligeras capas de hojarasca, en el cual habitualmente las hormigas construyen sus nidos.

La recolección se llevó a cabo de forma manual empleando guantes de látex y pinzas entomológicas estériles; las hormigas se almacenaron en tubos estériles y fueron transportadas en cajas térmicas en refrigeración (4°C) las cuales fueron procesadas mediante análisis microbiológicos en el Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Algunos individuos se colocaron en viales eppendorf con alcohol de 96° para su identificación taxonómica.



Figura 7. Punto de muestreo de las hormigas, ubicado en el distrito Mariano Dámaso Beraún-Huánuco, Perú. Fuente: Qgis 2.14.14.

5.2.2. Determinación taxonómica de las hormigas recolectadas

La identificación taxonómica fue determinada utilizando un estereoscópico (Nikon SMZ25) perteneciente al laboratorio de Entomología de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Las ediciones de las fotografías de los especímenes disponibles se realizaron mediante el software NIS-Elements (versión 4.0).

La identificación de la especie de hormigas cortadoras se realizó de acuerdo a los trabajos taxonómicos de Fernández & Sendoya (2004) para la determinación de la subfamilia y el género; mientras que la de Mackay & Mackay (1986) para la determinación de especie.

5.2.3. Aislamiento y cultivo de actinomicetos nativos

Según las pautas de León *et al.* (2007), modificadas por la autora del presente estudio; se realizó el aislamiento de los actinomicetos a partir de las cutículas de las hormigas, donde 10 g de hormigas limpias y secas fueron sumergidas en 90 mL de solución salina estéril (0.9%) homogenizando con vortex durante 1 minuto. La suspensión obtenida fue sometida a shock térmico de 70°C mediante baño maría durante 15 minutos, con el fin de eliminar bacterias y hongos no deseados presentes en la muestra. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina hasta la dilución final de 10^{-4} . Luego, se tomó 100 μ L de cada una de las diluciones (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) y se sembraron por duplicado sobre los medios de cultivo Agar Czapek (ACZ) y Agar Almidón Caseína (AAC), ambos suplementados con Cicloheximide (100 μ g/mL) como agente antifúngico y Ácido nalidíxico (25 μ g/mL) como antibiótico de bacterias Gram negativas (**Anexo 1**) (Kokare *et al.* 2007). Las placas fueron incubadas a 28°C durante un periodo de 15 a 20 días. Se aislaron colonias que presentaron características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, típicas de actinomicetos y se mantuvieron en ceparios de AAC más glicerina (20% v/v) para estudios posteriores (León *et al.* 2007).

5.2.4. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados

5.2.4.1. Caracterización macroscópica

Las características morfológicas de los actinomicetos se realizaron teniendo en cuenta el tamaño, forma, textura, margen, consistencia, color del anverso y reverso, y producción de pigmentos difusibles en los medios ISP (Internacional *Streptomyces*

Project): agar extracto de malta – levadura (ISP 2), agar avena (ISP 3), agar almidón – sales inorgánicas (ISP 4) y agar de glicerol asparagina (ISP 5) descritos por Shirling & Gottlieb (1966).

5.2.4.2. Caracterización microscópica

Las observaciones microscópicas de las esporas y estructuras miceliales se realizaron mediante la tinción Gram y el método de microcultivos “bloques de agar”. Los microcultivos fueron incubados en cámara húmeda a 28°C por 5 a 7 días (León *et al.* 2007) y observados en un microscopio óptico (Labomed). Se tuvieron en cuenta las características observadas por la tinción Gram, fragmentación del micelio en diferentes formas, agrupación de esporas, presencia de espirales, esporas terminales en pares o grupos en el micelio y se compararon con las descritas en el Manual de Determinación Bacteriológicas de Bergey (Bergey & Holt 2000).

5.2.5. Producción de enzimas extracelulares por actinomicetos aislados

Las propiedades bioquímicas de los actinomicetos se evaluaron a través de la producción de enzimas extracelulares mediante pruebas convencionales (León *et al.* 2014). Las cepas aisladas fueron sembradas en medios de cultivo base preparados y suplementados independientemente con sustratos específicos a una concentración de 1% (p/v), tales como: leche descremada, yema de huevo, Tween 80, almidón y gelatina nutritiva; a fin de evaluar la actividad de caseinasa, lecitinasa, lipasa, amilasa y gelatinasa, respectivamente (**Anexo 5**). Todos los medios de cultivo fueron incubados a 28°C por 5-7 días. La determinación cualitativa positiva se determinó midiendo los halos de actividad en la zona de crecimiento de los actinomicetos (León & García-Tello 1988). La determinación de la actividad amilolítica y de gelatinasa se realizó mediante la adición de una solución de Lugol (1:1) y la solución de cloruro mercúrico acidificada (HgCl₂), respectivamente, sobre la superficie de los medios de cultivos. Todas las pruebas enzimáticas fueron evaluadas por triplicado.

5.2.6. Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo “doble capa”

Los actinomicetos fueron enfrentados a bacterias y levaduras según la metodología de “doble capa” (León *et al.* 2007). Los actinomicetos fueron sembrados como macrocolonias en placas petri con AAC e incubados a 28°C por 5-7 días. Las cepas testigo bacterianas y las levaduras fueron reactivadas en Caldo Trypticasa Soya (TSB) y Caldo Sabouraud, respectivamente, las cuales fueron incubadas por menos de 24 horas hasta alcanzar la escala 0,5 de MacFarland o su equivalente óptico (10^6 UFC/mL). Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la inoculación de las cepas testigos en medio semisólido a modo de segunda capa sobre los cultivos de los actinomicetos. Los cultivos fueron incubados a sus respectivas temperaturas de crecimiento (37°C para las bacterias y 30°C para las levaduras) durante 24 horas. Pasado el tiempo, se realizaron las lecturas correspondientes observando los halos de actividad antagonista (diámetro en mm). Todo halo de inhibición de crecimiento de la cepa testigo se consideró como prueba positiva de actividad antagonista (**Anexo 2**). Las pruebas se realizaron por triplicado. Este ensayo permitió seleccionar a la cepa de actinomiceto como el microorganismo con mejor actividad antimicrobiana y seleccionarla para los siguientes ensayos.

5.2.7. Cultivo continuo para la obtención del extracto orgánico

La obtención de los extractos orgánicos se realizó según Pandey *et al.* (2004). Los actinomicetos seleccionados por su mayor capacidad antagónica, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL del Caldo Peptona – Extracto de levadura. Los matraces fueron colocados en incubación a temperatura ambiente en un “shaker” (IKA LABOR TECHNIK) a 250 rpm durante 10 días. Transcurrido el tiempo, los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 25 minutos, luego fueron filtrados y decantados en recipientes estériles para su procesamiento (**Anexo 3**).

5.2.8. Evaluación de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes recuperados fue evaluada mediante la prueba de pocillos (Mannangatti & Mathivanan 2011) para lo cual los sobrenadantes fueron tamizados sobre gasa estéril y luego filtrados utilizando membranas y filtros Millipore, ambos de 0,45 μm de porosidad. Los sobrenadantes de cada cultivo fueron colocados en pocillos preparados con antelación en placas de Agar Tripticasa Soya (TSA) para bacterias y Agar Dextrosa Sabouraud para las levaduras; ambos medios de cultivos sembrados previamente con la cepa testigo. Las placas se incubaron a 30 °C por 18-24 horas. La presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos fue considerada como resultado positivo de antibiosis. Las pruebas fueron realizadas por duplicado. La recuperación y concentración de los metabolitos antimicrobianos a partir de los sobrenadantes se realizó mediante la extracción con solventes orgánicos.

5.2.9. Extracción química de compuestos bioactivos

La extracción se realizó a partir de actinomicetos que fueron previamente seleccionados por presentar los mejores halos de actividad antagonista frente a las cepas testigo. Según las recomendaciones de Remya & Ramasamy (2008) con algunas modificaciones; los caldos de fermentación fueron sometidos al método de extracción utilizando solventes orgánicos de diferentes polaridades (acetato de etilo, diclorometano y hexano) para recuperar y concentrar los metabolitos antimicrobianos presentes en los cultivos. Los solventes fueron añadidos a los sobrenadantes en una proporción de 1:1 (v/v) y agitados vigorosamente durante 24 horas para completar la extracción (Liu *et al.* 1986). Cada una de las fases orgánicas obtenidas fueron concentradas a presión reducida utilizando un Rotavapor (BUCHI R-3000) a 40°C. Los volúmenes restantes fueron colocados en viales estériles y evaporados en una incubadora a 40°C. Finalmente, los residuos se pesaron y se re-suspendieron en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, obteniendo así las concentraciones iniciales de los extractos orgánicos

(mg/mL) los que serán evaluados posteriormente para la determinación de la actividad antimicrobiana (**Anexo 3**).

5.2.10. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos

Un volumen conocido de los extractos orgánicos recuperados y reconstituidos fueron colocados en pocillos de 5 mm practicados sobre el medio Mueller Hinton donde fue previamente sembrada la cepa testigo. Los cultivos fueron incubados a 30 °C para las levaduras y a 37 °C para las bacterias durante 24 horas (**Anexo 3**). La actividad antimicrobiana en todos los casos se determinó por la medida del tamaño del halo de inhibición (mm de diámetro) (Mannangatti & Mathivanan 2011, Pandey *et al.* 2004).

5.2.11. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos activos

La determinación de la CMI fue realizada siguiendo la metodología según Karthy *et al.* (2009). Las cepas testigos fueron *C. albicans* ATCC 10231, ATCC 7516 y ATCC 98028, *C. tropicalis* ATCC 7206, *C. parapsilosis* ATCC 7307. Las cepas testigos fueron mantenidas en Caldo Tripticasa Soya (TSB) a 30°C. A partir de un cultivo en fase exponencial se preparó una suspensión bacteriana con turbidez igual a 0,5 de la escala Mc Farland. Los extractos orgánicos fueron re-suspendidos en DMSO al 5% para obtener soluciones “stock” de 1 mg/mL. Se prepararon diluciones 1:2 de las soluciones, aplicando 10 µl de cada una en los pocillos de microdilución (Microplacas Pure Grade; Brand). Posteriormente, 80 µl de TSB fueron vertidos y mezclados con las soluciones de prueba. Finalmente, 10 µl de las suspensiones bacterianas fueron vertidos en los pocillos (**Anexo 4**). Las pruebas se realizaron por duplicado. El material fue colocado en incubación a 30°C por 18-24 horas. Se consideró como control negativo al DMSO 5% y como control positivo al antifúngico de referencia. Transcurrido el tiempo se vertió 40 µl de una solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC; 5mg/mL) como revelador de la prueba en cada pocillo, y se colocó nuevamente en incubación por 20 minutos

adicionales. El viraje del medio en cada pocillo a rojo fue considerado como indicativo de crecimiento microbiano. Se tomó como el valor de la CMI a la menor concentración de extracto en la que no hubo crecimiento.

5.2.12. Identificación molecular de los actinomicetos seleccionados

Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en caldos TSB por 5 días a 28°C, transcurrido los cinco días los caldos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El ADN se extrajo según las indicaciones del kit de purificación Vivantis®GF-1. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó el gen que codifica ARN ribosomal 16S, utilizando los siguientes primers: 16S 8F (5`-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3`) y 16S 1492R(I) (5`-GGTTACCTTGTTACGACTT-3`), bajo las siguientes condiciones: Denaturación inicial de 94 °C por 2 min, 25 ciclos de: denaturación (94 °C por 2 min.), alineamiento (45 °C por 1,5 min.), extensión (72 °C por 2 min.) y una extensión final de 72 °C por 3 min. Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Luego de confirmar los productos de PCR, éstos se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Se solicitó el secuenciamiento de 5 primers universales: 27f (AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG), 1492r (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), 518f (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC) y GM1r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG- 3'). El alineamiento de las secuencias fue realizado mediante el software BioEdit 7.0.9. Las secuencias obtenidas se compararon las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschup *et al.* 1990). La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el algoritmo Neighbor-Joining y el método Kimura-2-parámetros ofrecido por el programa MEGA 7. El árbol se realizó con el análisis tipo bootstrap de 1000 réplicas para evaluar la estabilidad relativa de las ramas (Tamura *et al.* 2013).

5.2.13. Análisis estadístico

El criterio utilizado fueron las medidas de los halos de inhibición sobre el crecimiento de la cepa testigo como prueba positiva de actividad antagonista mediante el modelo factorial de Análisis de Varianza (ANOVA). Asimismo, para identificar diferencias estadísticas significativas entre los factores establecidos se utilizó la prueba de Tuckey al 95% de confianza. La evaluación se realizó mediante el programa estadístico para Windows SPSS versión 22.0.

6. RESULTADOS

6.1. Descripción taxonómica de las hormigas colectadas

Las hormigas cortadoras de hojas recolectadas en el presente estudio fueron determinadas taxonómicamente como pertenecientes a la especie ***Atta cephalotes*** (Linnaeus, 1758).

ORDEN: Hymenoptera Linnaeus, 1758

SUBORDEN: Apocrita

FAMILIA: Formicidae Latreille, 1809

SUBFAMILIA: Myrmicinae Latreille 1807

TRIBU: Attini

Género: *Atta* Fabricius, 1804

Especie: *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758)

Morfología externa: La cabeza es lisa y brillante con los lados convexos y de color más claro que el tórax (**Figura 8C**). El margen superior de la cabeza es poco emarginado donde los lóbulos occipitales presentan pilosidad abundante y densa (**Figura 8B**). Las espinas occipitales son más cortas que el máximo diámetro del ojo y están dirigidas hacia atrás (**Figura 8A**). Las mandíbulas son alargadas, estrechas, muy curvadas en vista lateral y de borde externo sinuoso en vista frontal. La antena presenta once segmentos (un escapo y funículo de 10 segmentos) (**Figura 8B**). El dorso del promesonoto presentan dos pares de espinas y poca pubescencia, donde las espinas pronatales presentan longitudes variables (**Figura 8A**). El propodeo presenta un par de espinas largas y dirigidas hacia atrás. El primer tergo del opistogáster es liso y cubierto con abundante pilosidad (**Figura 8A**).

Distribución conocida: Presentes en la región Neotropical y los países donde se han confirmado su presencia son: México, Honduras, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Trinidad, Panamá, Colombia, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Brasil y Perú (Cusco, Junín, Madre de Dios, Huánuco, Cajamarca, San Martín y Loreto).

Diagnosis y comentarios. La identificación de las obreras mayores no representa un problema para su identificación, pero en el caso de las demás castas los caracteres no son fácilmente observables o pueden llegar a ser muy similares a otras especies. Por esta razón, de ser posible, las muestras deben venir acompañadas de obreras mayores asociadas para tener una mayor certeza en la identificación.

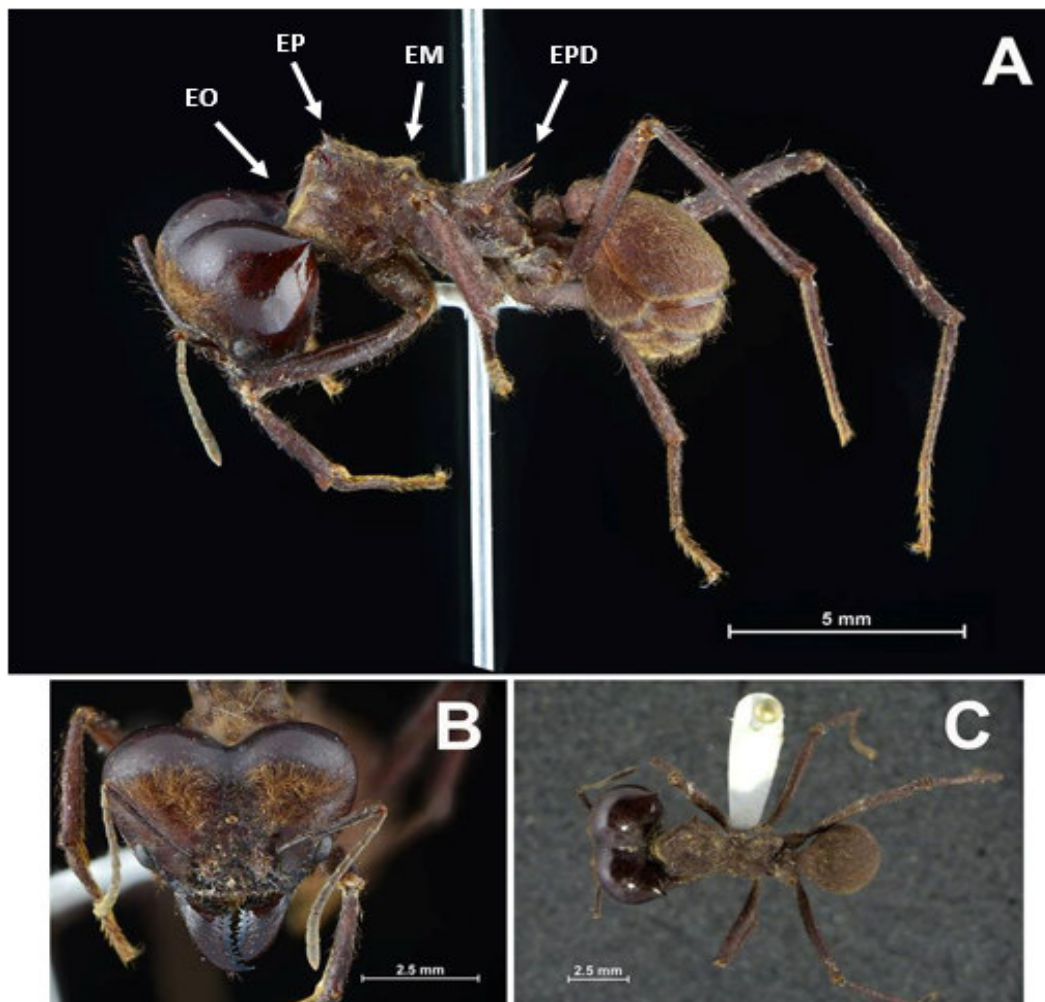


Figura 8. *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758). **A.** Morfología general en vista lateral. **B.** Vista frontal. **C.** Vista dorsal. **Abreviaturas:** **EO:** Espina occipital; **EP:** Espina pronotal; **EM:** Espina mesonotal; **EPD:** Espinas propodeales

6.2. Aislamiento de actinomicetos nativos

Se recuperaron 40 aislamientos con características morfológicas semejantes a los actinomicetos. De éstas, 30 se confirmaron de acuerdo a la tinción Gram y las características fenotípicas de los actinomicetos, los cuales presentan consistencia seca y compacta, fuertemente adheridas al medio sólido, de apariencia aterciopelada granulosa o pulverulenta y con o sin producción de pigmento. Del total de colonias presuntivas de actinomicetos, 24 aislados se recuperaron en AAC y sólo 6 en ACZ.

6.3. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados

La caracterización macroscópica de las 30 cepas de actinomicetos se indica en la **Tabla 2**. El crecimiento de los actinomicetos ocurre entre los 7 y 15 días. El tamaño de las colonias es variable desde 4 mm hasta colonias de 15 mm de diámetro, además los morfotipos predominantes fueron colonias de color blanco-grisáceas, bordes irregulares, elevadas o planas, convexa, borde liso y consistencia dura. El 40% del total de colonias aisladas presentaron pigmentaciones difusibles en el medio Extracto Malta-Levadura (ISP 2) siendo la pigmentación marrón tenue la más frecuente. Las técnicas de tinción Gram y microcultivo permitieron observar detalles del micelio aéreo y vegetativo, fragmentación del micelio y la agrupación de esporas a manera de espiral, típica del género *Streptomyces*.

Las colonias de la cepa denominada como HHA-4 fueron de color blanco en el anverso, es decir, el color del micelio aéreo, y en el reverso, el cual corresponde al micelio vegetativo, presentó una ligera pigmentación beige. La superficie es pulverulenta, de elevación convexa y/o umbonada y consistencia frágil (**Figura 9A y 9B**). La tinción Gram de la cepa HAA-4 a partir de 7 días de incubación mostró filamentos ramificados Gram positivos delgados y largos (**Figura 9C**). El microcultivo permitió observar esporas tanto individuales como originadas de las hifas ramificadas no fragmentadas, organizadas en forma de cadenas largas y enrolladas en espiral; esta

propiedad es característica del género *Streptomyces*. La tinción con azul de Lactofenol permitió apreciar la forma de las hifas onduladas delgadas, con ramificaciones no fragmentadas, que se originan en un centro común, formando la red del micelio (Figura 9D).

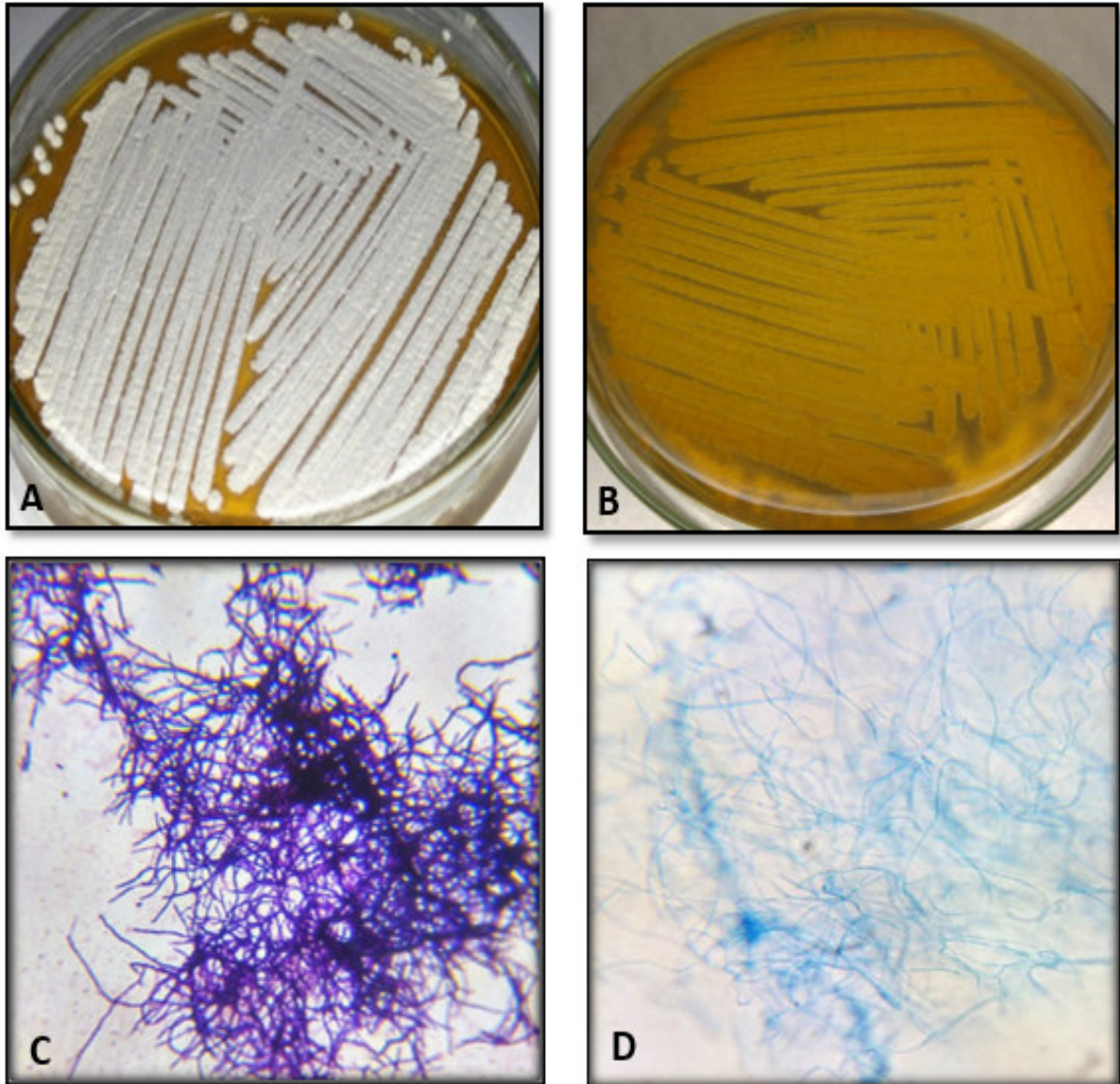


Figura 9. Actinomiceto HAA-4 en el medio agar extracto de malta – levadura (ISP 2)

A. Morfología macroscópica del micelio aéreo. **B.** Morfología macroscópica del micelio vegetativo. **C.** Tinción Gram **D.** Microcultivo con tinción azul de Lactofenol.

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las 30 cepas de actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* procedentes del distrito Mariano Dámaso Beraún – Huánuco, Perú.

Actinomiceto (n=30)	Colonia				
	Color	Forma	Elevación	Borde	Pigmento
HAA-1	Marrón	Irregular	Pulvinada	Entero	Marrón
HAA-2	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Lobulado	Marrón
HAA-3	Blanco	Circular	Convexa	Entero	NC
HAA-4	Blanco	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Beige
HAA-5	Blanco	Irregular	Elevada	Entero	Marrón
HAA-6	Beige	Irregular	Convexa	Lobulado	NC
HAA-7	Blanco	Irregular	Convexa	Lobulado	NC
HAA-8	Marrón	Irregular	Convexa	Ondulado	Marrón
HAA-9	Beige	Irregular	Convexa	Ondulado	Beige
HAA-10	Blanco	Circular	Elevada	Entero	NC
HAA-11	Blanco	Irregular	Convexa	Entero	NC
HAA-12	Blanco	Circular	Elevada	Entero	NC
HAA-13	Beige	Irregular	Convexa	Ondulado	Marrón
HAA-14	Blanco	Circular	Elevada	Entero	NC
HAA-15	Blanco	Circular	Elevada	Entero	NC
HAA-16	Blanco	Irregular	Convexa	Ondulado	NC
HAA-17	Beige	Irregular	Convexa	Lobulado	Marrón
HAC-18	Blanco	Circular	Plana	Entero	NC
HAC-19	Beige	Irregular	Elevada	Lobulado	NC
HAC-20	Blanco	Filamentosa	Elevada	Erosionado	NC
HAC-21	Gris	Filamentosa	Convexa	Filamentoso	NC
HAC-22	Blanco	Irregular	Elevada	Ondulado	NC
HAC-23	Blanco	Irregular	Elevada	Ondulado	NC
HAA-24	Beige	Circular	Convexa	Entero	Marrón
HAA-25	Marrón	Irregular	Convexa	Lobulado	Marrón
HAA-26	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Marrón
HAA-27	Blanco	Circular	Convexa	Entero	NC
HAA-28	Beige	Irregular	Pulvinada	Lobulado	Marrón
HAA-29	Blanco	Circular	Elevada	Entero	NC
HAA-30	Blanco	Circular	Convexa	Entero	NC

NC: Natural (sin pigmentación)

6.4. Producción de Enzimas Extracelulares (EEC) por actinomicetos aislados

De los 30 actinomicetos evaluados, 22 producen algún tipo de enzima extracelular (**Tabla 3**). Se determinó cualitativamente la producción de enzimas extracelulares en la mayoría de los aislados, siendo el 63% productores de lecitinasas, 60% de amilasas, 53% de caseinasas, 50% de estererasas y 40% de gelatinasa. Los actinomicetos que mostraron mayores halos de actividad enzimática fueron los productores de amilasas, siendo la cepa HAA-6 la que presenta mayor actividad amilolítica (**Figura 10**). Igualmente, los actinomicetos productores de gelatinasas y caseinasas fueron significativas, siendo la cepa HAA-21 la que tiene la mayor actividad enzimática para ambos sustratos, tal como se puede observar en la **Figura 11** y **Figura 12** respectivamente. Los actinomicetos productores de tween estererasas presentaron halos de mediana actividad enzimática (**Figura 13**). Se destacan las cepas HAA-4, HAA-6, HAA-21 y HAA-25 como las más significativas en la producción de las 5 enzimas extracelulares determinadas en este estudio (**Tabla 3**).

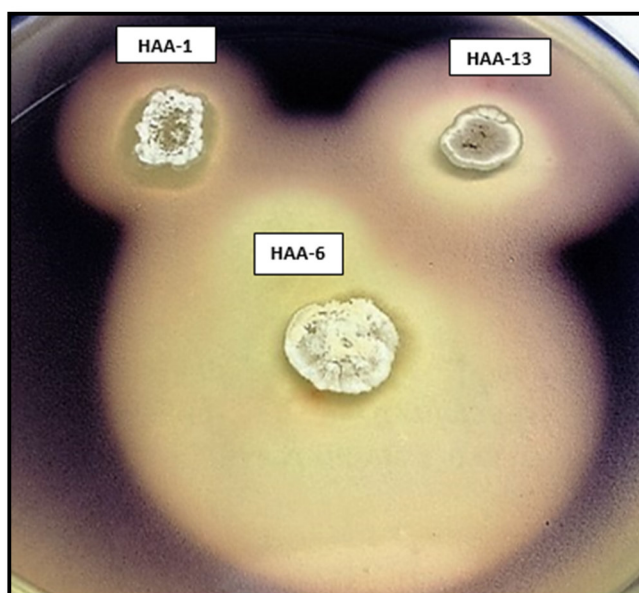


Figura 10. Actividad amilolítica de las cepas HAA-1, HAA-6 y HAA-13. Se destaca la actividad de la cepa HAA-6. Se utilizó el colorante Lugol para revelar el almidón no digerido. Un halo incoloro alrededor de la colonia indica la hidrólisis del almidón.

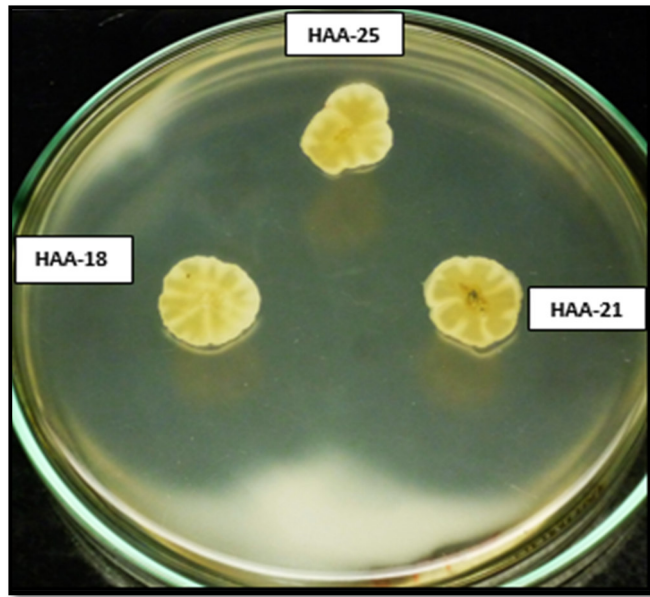


Figura 11. Hidrólisis de la gelatina por las cepas HAA-18, HAA-21, HAA-25, cuyas colonias presentan halos transparentes como producto de la actividad enzimática de la gelatinasa microbiana. Revelado con bicloruro de mercurio.

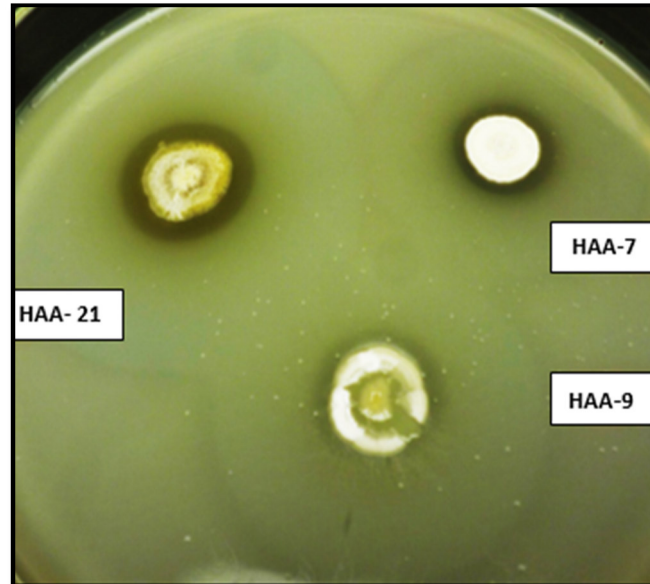


Figura 12. Producción de caseinasas por las cepas HAA-7, HAA-9 y HAA-21. Las formaciones de un halo transparente alrededor de las colonias de actinomicetos indican la actividad de esta enzima.

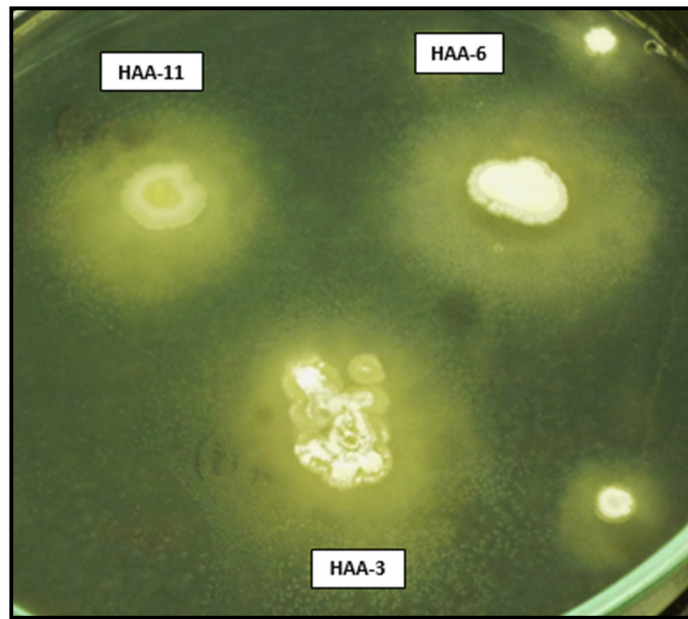


Figura 13. Actividad lipolítica de las cepas HAA-3, HAA-6 y HAA-11 provocada por las tween esterasas. Se evidencia la formación de un halo opaco del medio agar Tween 80, alrededor de las colonias de actinomicetos.

Tabla 3. Producción de enzimas extracelulares de actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* frente a diversos sustratos

Actinomicetos	Porcentaje de actividad enzimática extracelular (% \pm σ)				
	Lecitinasa	Lipasa	Caseinasa	Amilasa	Gelatinasa
HAA-1	62,5 \pm 0.1	50 \pm 0.2	-	66,3 \pm 0.2	52,1 \pm 0.1
HAA-2	68,8 \pm 0.3	58,8 \pm 0.3	46.6 \pm 0.1	65,5 \pm 0.1	38,4 \pm 0.1
HAA-3	58,8 \pm 0.2	42,1 \pm 0.1	58,7 \pm 0.3	73,8 \pm 0.1	45,3 \pm 0.2
HAA-4	54,5 \pm 0.1	62,5 \pm 0.2	59,8 \pm 0.2	73,8 \pm 0.2	48,9 \pm 0.3
HAA-5	-	70,3 \pm 0.1	68,7 \pm 0.1	65,2 \pm 0.1	-
HAA-6	50 \pm 0.2	66,0 \pm 0.3	57,6 \pm 0.1	77,9 \pm 0.1	47,2 \pm 0.2
HAA-7	50 \pm 0.1	-	73,5 \pm 0.2	-	50,7 \pm 0.1
HAA-8	68,6 \pm 0.3	-	69,2 \pm 0.3	-	-
HAA-9	57,6 \pm 0.1	-	64,5 \pm 0.3	-	-
HAA-10	-	-	-	-	-
HAA-11	70,6 \pm 0.2	61,9 \pm 0.2	55,3 \pm 0.1	65,7 \pm 0.2	36,2 \pm 0.3
HAC-12	-	-	-	-	-
HAC-13	62,3 \pm 0.1	46,6 \pm 0.1	-	69,1 \pm 0.1	-
HAC-14	-	-	-	54,6 \pm 0.2	-
HAC-15	-	-	-	-	-
HAA-16	59,1 \pm 0.3	-	29,7 \pm 0.2	66,8 \pm 0.1	-
HAA-17	64,8 \pm 0.1	67,8 \pm 0.1	73 \pm 0.1	69,1 \pm 0.1	-
HAA-18	43,7 \pm 0.1	60,1 \pm 0.3	62,5 \pm 0.1	67,8 \pm 0.3	58,4 \pm 0.1
HAA-19	-	-	-	-	-
HAA-20	-	-	-	-	-
HAA-21	53,3 \pm 0.2	70,5 \pm 0.1	75,4 \pm 0.1	66,6 \pm 0.2	62,5 \pm 0.2
HAA-22	61,1 \pm 0.1	68,4 \pm 0.2	70	66,1 \pm 0.1	-
HAA-23	63,8 \pm 0.3	27,2 \pm 0.1	71,4 \pm 0.2	75,2 \pm 0.2	46,3 \pm 0.1
HAA-24	-	-	-	60 \pm 0.1	-
HAA-25	56,2 \pm 0.1	58,3 \pm 0.3	74,9 \pm 0.1	74,1 \pm 0.2	57,2 \pm 0.3
HAA-26	-	-	-	-	-
HAA-27	70 \pm 0.2	66,6 \pm 0.1	-	65,2 \pm 0.3	-
HAA-28	58,3 \pm 0.1	-	57,6 \pm 0.1	-	47,2 \pm 0.1
HAC-29	-	-	-	-	-
HAC-30	-	-	-	-	-

σ : Desviación estándar

6.5. Prueba cualitativa de antibiosis mediante el bioensayo “doble capa”

6.5.1. Actividad antibacteriana

De los 30 actinomicetos evaluados, 5 cepas (17%) presentaron actividad antibacteriana frente al patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 4 (13%) frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 2 (7%) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 y *S. aureus* ATCC 6538 y finalmente solo 1 cepa (3%) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 51922 (Tabla 4).

La cepa denominada como HAA-4 fue la que presentó mayor actividad inhibitoria frente a *B. subtilis* ATCC 6633 con un halo de inhibición de 17 mm de diámetro de inhibición; asimismo cabe mencionar que la cepa HAA-4 fue quien presentó actividad antagónica frente a cinco de los seis patógenos evaluados en el presente estudio (Tabla 4 y Figura 14). Por tanto, el actinomiceto HAA-4 fue seleccionado para estudios posteriores.

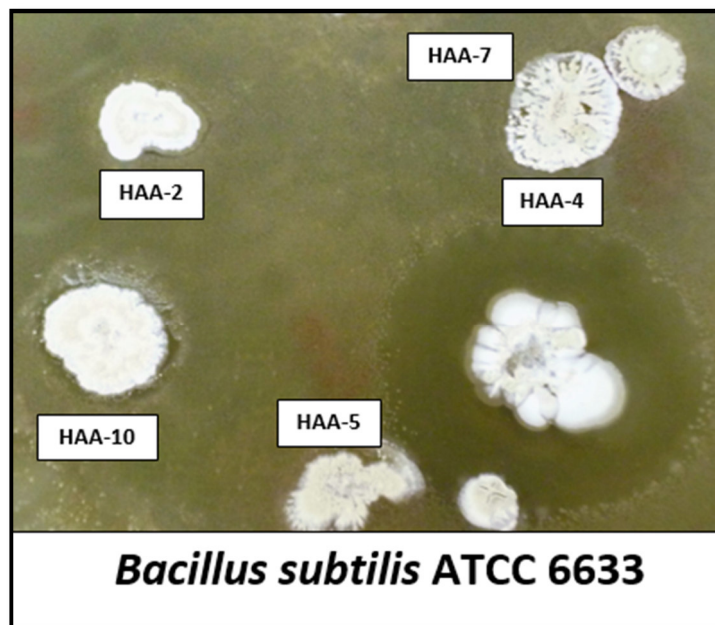


Figura 14. Actividad inhibitoria mediante el bioensayo “doble capa” por parte del actinomiceto HAA-4 frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Prueba realizada en el Agar Almidón Caseína.

Tabla 4. Halos de inhibición de actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas por el método de “doble capa”.

Actinomiceto	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S.aureus</i> ATCC 6533	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.faecalis</i> ATCC 51923
HAA-1	-	-	-	-	-	-
HAA-2	-	-	-	-	12,5 ± 0.1	-
HAA-3	7,3 ± 0.1	8,2 ± 0.2	15,4 ± 0.1	-	7,4 ± 0.2	-
HAA-4	7,1 ± 0.2	17,3 ± 0.1	8,6 ± 0.2	-	9,7 ± 0.3	8,8 ± 0.2
HAA-5	-	-	-	-	-	-
HAA-6	-	13,4 ± 0.3	-	-	12,4 ± 0.3	-
HAA-7	-	-	-	-	-	-
HAA-8	-	-	-	-	-	-
HAA-9	-	-	-	-	-	-
HAA-10	-	-	-	-	-	-
HAA-11	-	10,2 ± 0.1	-	-	13,6 ± 0.1	-
HAA-12	-	-	-	-	-	-
HAA-13	-	-	-	-	-	-
HAA-14	-	-	-	-	-	-
HAA-15	-	-	-	-	-	-
HAA-16	-	-	-	-	-	-
HAA-17	-	-	-	-	-	-
HAA-18	-	-	-	-	-	-
HAA-19	-	-	-	-	-	-
HAA-20	-	-	-	-	-	-
HAA-21	-	-	-	-	-	-
HAA-22	-	-	-	-	-	-
HAA-23	-	-	-	-	-	-
HAA-24	-	-	-	-	-	-
HAA-25	-	-	-	-	-	-
HAA-26	-	-	-	-	-	-
HAA-27	-	-	-	-	-	-
HAA-28	-	-	-	-	-	-
HAA-29	-	-	-	-	-	-
HAA-30	-	-	-	-	-	-

*Los resultados se expresan como halos de inhibición (mm de diámetro) más la desviación estándar

6.5.2. Actividad antifúngica

De acuerdo al test de actividad inhibitoria mediante el bioensayo “doble capa” se evaluaron 30 actinomicetos, de los cuales 14 aislamientos (47%) presentaron actividad antagonista frente a *Candida albicans* ATCC 7516, 13 cepas (43%) frente a *C. parapsilosis* ATCC 7307, 11 (37%) frente a *C. tropicalis* ATCC 7206 y *C. albicans* ATCC 10231 y 9 (30%) a *C. albicans* ATCC 98028 (**Figura 15**).

Las cepas de actinomicetos que presentaron mayor actividad antifúngica fueron las asignadas como HAA-17 y HAA-16, ambas frente a *C. albicans* ATCC 10231 con porcentajes de inhibición de 87% y 86 % respectivamente (**Figura 17**); seguidas de la cepa HAA-1 quien presentó 83% de inhibición frente a *C. albicans* ATCC 7516 (**Figura 18**); mientras que la cepa HAA-6 presentó el menor porcentaje de inhibición de 27% frente a *C. tropicalis* ATCC 7206. Asimismo, del total de 30 actinomicetos aislados, 16 cepas resultaron tener actividad antifúngica frente al menos una cepa del género *Candida*. Finalmente se destaca la actividad antagónica de las cepas HAA-17, HAA-19, HAA-21, HAA-23, HAA-26 y HAA-27 quienes presentaron actividad antifúngica frente a las 5 cepas del género *Candida* evaluadas en el presente estudio (**Tabla 5 y Figura 16**). Las cepas denominadas como HAA-16 y HAA-17 fueron seleccionadas para evaluaciones posteriores por su mayor actividad antifúngica.

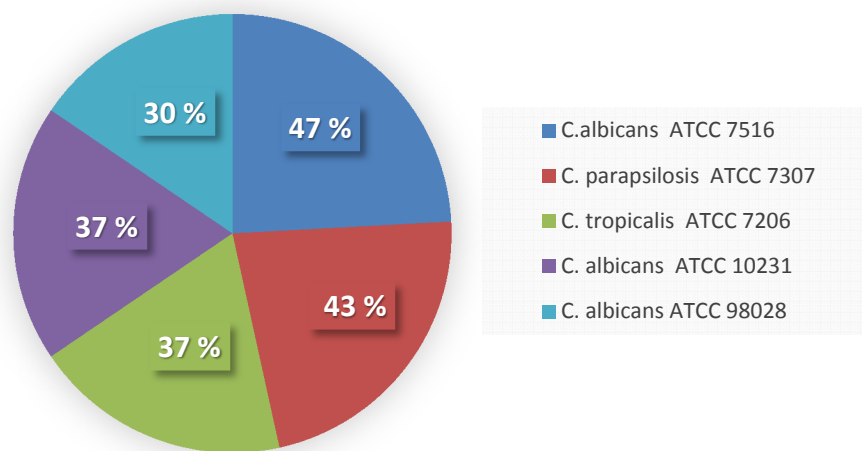


Figura 15. Actividad antifúngica de los actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* frente a levaduras del género *Candida*.

Tabla 5. Actividad antifúngica de 30 actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* frente a levaduras del género *Candida*.

Actinomicetos	<i>C.tropicalis</i> ATCC 7206	<i>C.albicans</i> ATCC 98028	<i>C.albicans</i> ATCC 7516	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 7307	<i>C.albicans</i> ATCC 10231
HAA-1	78,5 ± 0.2	-	83,2 ± 0.1	80,2 ± 0.1	-
HAA-2	-	-	-	-	-
HAA-3	-	-	*	-	-
HAA-4	-	70,4 ± 0.1	82,1 ± 0.1	-	74,2 ± 0.1
HAA-5	-	-	-	-	-
HAA-6	27,3 ± 0.1	-	-	79,6 ± 0.1	-
HAA-7	58,2 ± 0.1	-	-	-	-
HAA-8	-	-	-	-	-
HAA-9	-	-	64,9 ± 0.1	66.7 ± 0.2	76,3 ± 0.1
HAA-10	-	-	-	-	-
HAA-11	-	60,2 ± 0.2	62,8 ± 0.1	63,4 ± 0.1	76,8 ± 0.3
HAC-12	-	-	-	-	-
HAC-13	-	-	*	-	-
HAC-14	-	-	*	-	-
HAC-15	-	-	*	-	-
HAA-16	79,1 ± 0.1	40,5 ± 0.1	74,1 ± 0.1	-	86,2 ± 0.1
HAA-17	72,3 ± 0.3	66,3 ± 0.1	75,2 ± 0.2	37,2 ± 0.3	87,1 ± 0.1
HAA-18	-	-	77,2 ± 0.1	66,2 ± 0.1	-
HAA-19	81,6 ± 0.1	79,3 ± 0.1	78,4 ± 0.1	70,7 ± 0.1	68,3 ± 0.2
HAC-20	-	-	*	-	-
HAA-21	70,3 ± 0.2	79,5 ± 0.3	76,2 ± 0.1	71,5 ± 0.1	82,3 ± 0.1
HAA-22	-	35,4 ± 0.3	75,3 ± 0.1	38,6 ± 0.2	74,7 ± 0.1
HAA-23	77,7 ± 0.1	70,8 ± 0.1	78,6 ± 0.1	80,4 ± 0.1	79,3 ± 0.1
HAA-24	-	-	*	-	-
HAA-25	74,5 ± 0.2	-	79,4 ± 0.1	80,2 ± 0.1	-
HAA-26	77,4 ± 0.1	79,1 ± 0.1	67,3 ± 0.2	71,6 ± 0.1	67,6 ± 0.2
HAA-27	65,3 ± 0.3	38,6 ± 0.2	82,4 ± 0.1	46,7 ± 0.3	70,4 ± 0.1
HAA-28	-	-	*	-	-
HAC-29	-	-	*	-	-
HAC-30	-	-	*	-	-

*Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (%) más la desviación estándar

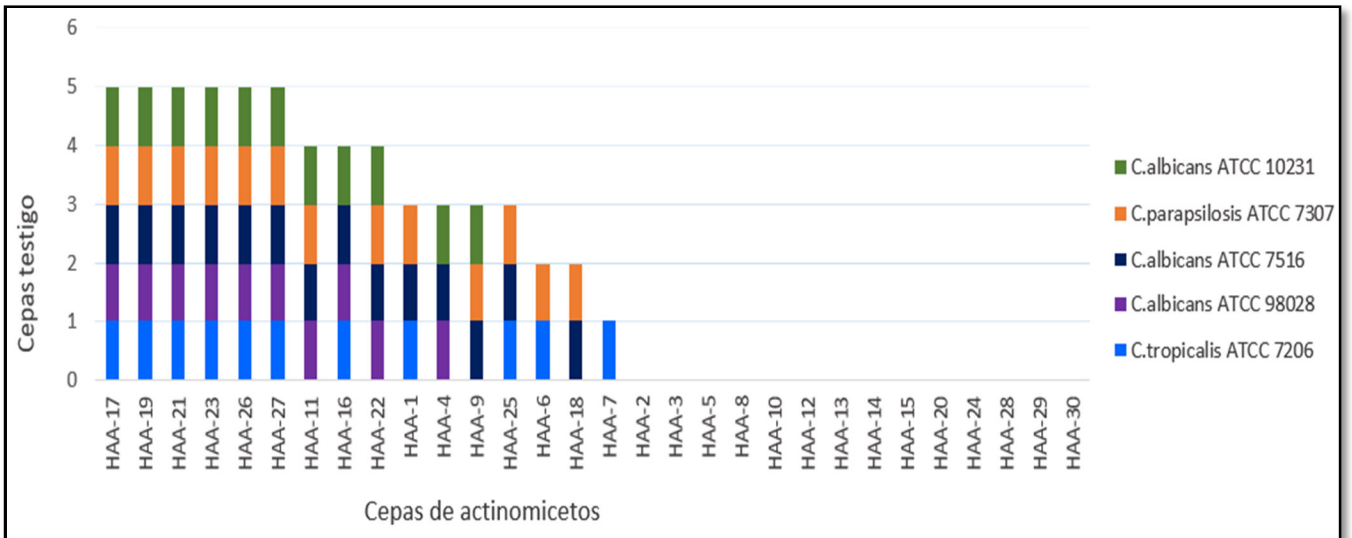


Figura 16. Frecuencia de la actividad antifúngica de las 30 cepas de actinomicetos frente a las levaduras del género *Candida*

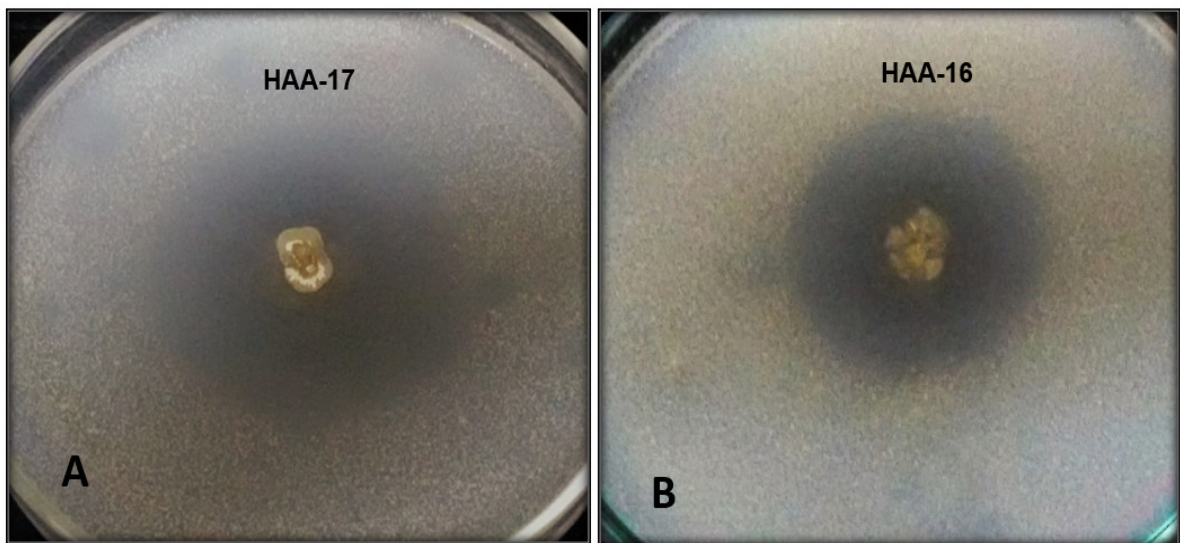


Figura 17. Actividad antifúngica por el método “doble capa” de los actinomicetos asignados como HAA-17 (A) y HAA-16 (B) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ensayo realizado sobre el medio de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa.

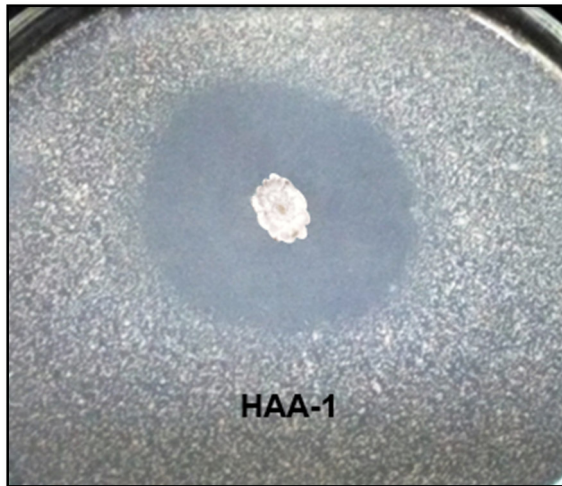


Figura 18. Actividad inhibitoria del actinomiceto HAA-1 frente a *Candida albicans* ATCC 7516. Prueba realizada sobre el medio Agar sabouraud dextrosa.

En base a los resultados obtenidos gracias al método de ensayo “doble capa”, se determina que, del total de 30 actinomicetos aislados, 5 presentaron actividad antibacteriana mientras que 16 tienen actividad antifúngica. Además, cabe mencionar que las cepas de actinomicetos asignadas como HAA-4, HAA-6 y HAA-11, resultaron tener actividad antagónica de amplio espectro frente a bacterias y levaduras evaluadas en el presente estudio (**Figura 19**).

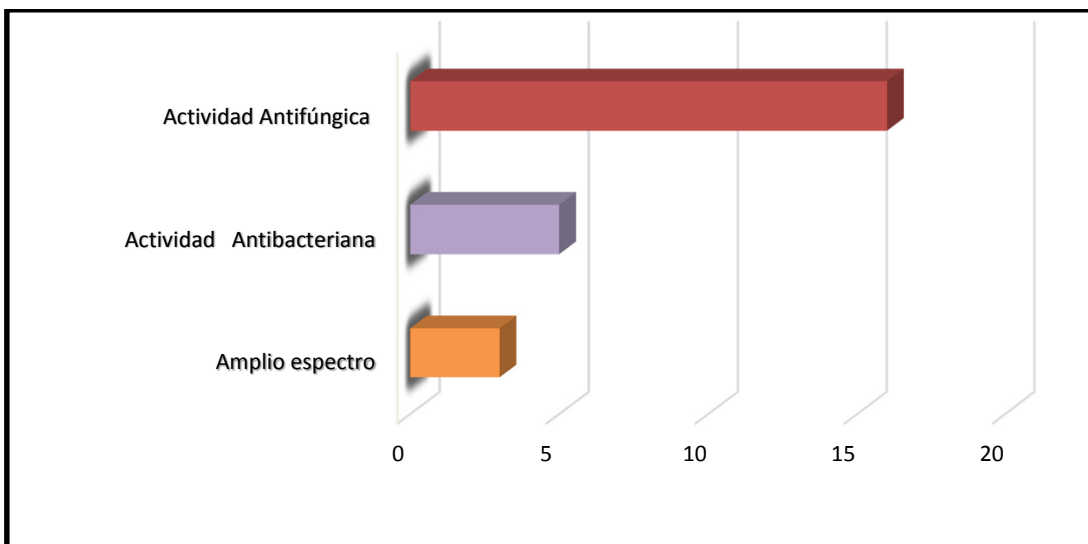


Figura 19. Número de actinomicetos aislados de *Atta cephalotes* y su actividad antimicrobiana.

6.6. Características de los cultivos continuos de las cepas seleccionadas

Los cultivos continuos de las cepas HAA-4, HAA16 y HAA-17 presentaron características variables de crecimiento en el Caldo peptona –extracto de levadura. El crecimiento de las cepas HAA-16 y HAA-17 en los cultivos líquidos se determinaron por la presencia de agrupaciones filamentosas o “pellets” (**Figura 20**), tal como se ha descrito respecto al crecimiento de los actinomicetos en medios líquidos (Franco-Correa 2008), mientras que en el cultivo de la cepa HAA-4 se pudo observar la no agrupación de los filamentos. Es importante tener en cuenta que tanto los componentes del medio de cultivo como los parámetros de crecimiento, fueron piezas fundamentales para que se lleve a cabo el crecimiento óptimo de los cultivos continuos.



Figura 20. Agrupaciones filamentosas o “pellets” del actinomiceto HAA-17 en un matraz de caldo peptona- extracto de levadura con agitación de 200 rpm a 30°C.

6.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes

La evaluación antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas elegidas frente a las bacterias y levaduras arrojaron resultados confirmatorios respecto a las pruebas anteriores; por ejemplo, tenemos el enfrentamiento de las cepas denominadas como HAA-4, HAA-16 y HAA-17 frente a *Candida albicans* ATCC 10231, las cuales mostraron halos de inhibición de 5, 8 y 17 mm de diámetro respectivamente (**Figura 21**).

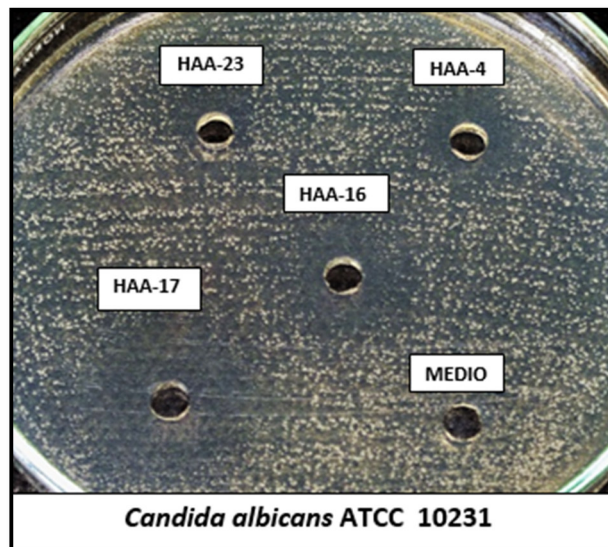


Figura 21. Actividad antifúngica de los sobrenadantes de las cepas HAA-4, HAA-16, HAA-17 frente a *C. albicans* ATCC 10231. El control negativo fue el Caldo Peptona-Extracto de levadura.

6.8. Obtención de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados

Los extractos orgánicos de los actinomicetos fueron concentrados hasta obtener los pesos secos de cada cepa, tal como se muestra en la **Tabla 6**. Los resultados evidencian que el diclorometano y acetato de etilo (ambos de polaridad intermedia) presentan las mejores características de retención de los compuestos antimicrobianos, hecho ratificado en los ensayos de difusión en pocillo que se detallará más adelante.

Tabla 6. Pesos secos de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados

Actinomiceto	Acetato de etilo *	Diclorometano *	Hexano *
HHA- 4	6,8	11,1	2,5
HAA- 16	13,5	6,5	3,5
HAA- 17	12,3	9,1	3,8

*Peso seco en mg

6.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos

La **Tabla 7** muestra los resultados de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de acetato de etilo, diclorometánico y hexánico de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17, los cuales fueron previamente seleccionados en base a su mayor actividad antifúngica. Los extractos obtenidos con acetato de etilo y diclorometano de ambos actinomicetos, presentaron halos de actividad antifúngica contra las 5 levaduras evaluadas, siendo los extractos de acetato de etilo los que presentaron mayores halos de inhibición. El extracto de acetato de etilo del actinomiceto HAA-17 fue el que presentó el mayor halo de inhibición frente a *C. parapsilosis* ATCC 7307, generando halos de inhibición de 30 mm de diámetro (equivalente a 86 % de inhibición), valores muy cercanos al del control positivo Fluconazol (20 µg/mL), el cual alcanzó halos de inhibición de 33 mm de diámetro (87 % de inhibición) (**Figura 22**). El enfrentamiento con *C. albicans* ATCC 10231 generó halos de inhibición de 27 mm de inhibición (84% de inhibición), valores cercanos a los del Fluconazol, quien presentó halos de inhibición de 38 mm de diámetro (88% de inhibición) (**Figura 23**). Los extractos diclorometánicos también presentaron resultados favorables para determinadas especies del género *Candida* (**Figura 24**). Por otra parte, los extractos hexánicos mostraron tener limitada capacidad inhibitoria contra las levaduras evaluadas. Asimismo, en la **Tabla 8** se muestra los halos de inhibición de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-4, el cual presentó amplio espectro en pruebas anteriores. Los extractos diclorometánicos de la cepa HAA-4 presentaron mayores rendimientos de inhibición en comparación con los extractos de acetato de etilo. El extracto diclorometánico de la cepa HAA-4 solamente mostró inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51922. Los halos de inhibición fueron de 13 mm (equivalente a 71% de inhibición) frente a *E. faecalis* ATCC 51922 y 12 mm (70% de inhibición) frente a *S. aureus* ATCC 25923; en comparación con el control positivo Ciprofloxacino (100 µg/mL), el cual alcanzó halos de 30 mm de diámetro (86% de inhibición) (**Figura 25**). Asimismo, los extractos

diclorometánicos de la cepa HAA-4 presentaron halos de inhibición de 15 mm de diámetro (equivalente a 75% de inhibición) frente a *C. albicans* ATCC 7516 y 14 mm de diámetro (74% de inhibición) frente a *C. albicans* ATCC 10231; en comparación con el control positivo Fluconazol (20 µg/mL) de 38 mm de diámetro (88% de inhibición)

(Tabla 8). Los extractos hexánicos de la cepa HAA-4, no presentaron actividad frente a las bacterias Gram positivas y *Candida albicans*. La actividad inhibitoria de los extractos orgánicos frente a las bacterias Gram negativas no fue detectada en los ensayos evaluados.

Esta información cualitativa nos permitió proceder con el cálculo de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI).

Tabla 7. Actividad antifúngica de extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 aislados de *Atta cephalotes* frente a levaduras de importancia clínica.

Actinomiceto	Solvente	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
	orgánico	ATCC 7516	ATCC 7307	ATCC 7206	ATCC 98028	ATCC 10231
HAA-16	Acetato de etilo	20,2 ± 0.1	17,2 ± 0.2	15,2 ± 0.1	20,1 ± 0.1	19,2 ± 0.1
	Diclorometano	18,3 ± 0.1	12,2 ± 0.1	22,1 ± 0.1	19,1 ± 0.2	15,1 ± 0.2
	Hexano	-	-	-	8,9 ± 0.3	11,8 ± 0.2
HAA-17	Acetato de etilo	26,2 ± 0.2	30,1 ± 0.3	24,2 ± 0.2	26,2 ± 0.2	27,2 ± 0.2
	Diclorometano	18,3 ± 0.1	15,3 ± 0.1	13,3 ± 0.1	14,1 ± 0.3	15,3 ± 0.1
	Hexano	8,6 ± 0.3	11,8 ± 0.3	-	-	9,6 ± 0.4
Control +	Fluconazol	30,3 ± 0.1	33,2 ± 0.1	38,2 ± 0.1	41,2 ± 0.2	38,2 ± 0.1
Control -	Solventes	-	-	-	-	-

*Los resultados se expresan como halos de inhibición (mm de diámetro)

Tabla 8. Actividad inhibitoria de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-4 aislado de *Atta cephalotes* frente a bacterias Gram positivas y *Candida albicans*.

Actinomiceto	Solvente orgánico	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
		ATCC 25923	ATCC 51922	ATCC 7516	ATCC 10231
HAA-4	Acetato de etilo	13,1± 0.1	5,6± 0.3	11,4± 0.2	7,6± 0.1
	Diclorometano	12,3± 0.1	13,2± 0.1	15,3± 0.1	14,2± 0.2
	Hexano	-	-	-	-
	Control +	32,2± 0.1	30,3± 0.1	30,2± 0.2	38,3± 0.1
Control -	Solvente	-	-	-	-

*Los resultados se expresan como halos de inhibición (mm de diámetro)

Control positivo : Ciproflaxacino (Gram positivas), Fluconazol (*Candida* sp)

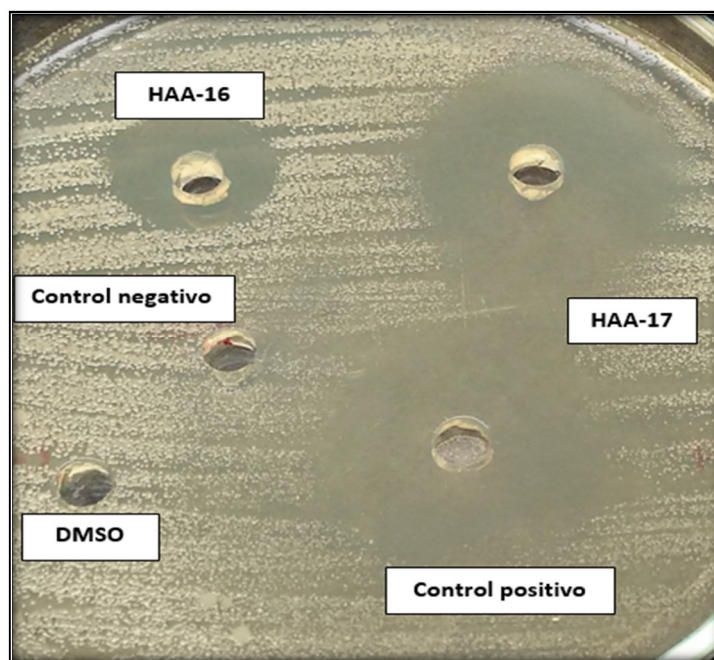


Figura 22. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo frente a *Candida parapsilosis* ATCC 7307. **Control positivo:** Fluconazol (20 µg/mL). **Control negativo:** Acetato de etilo

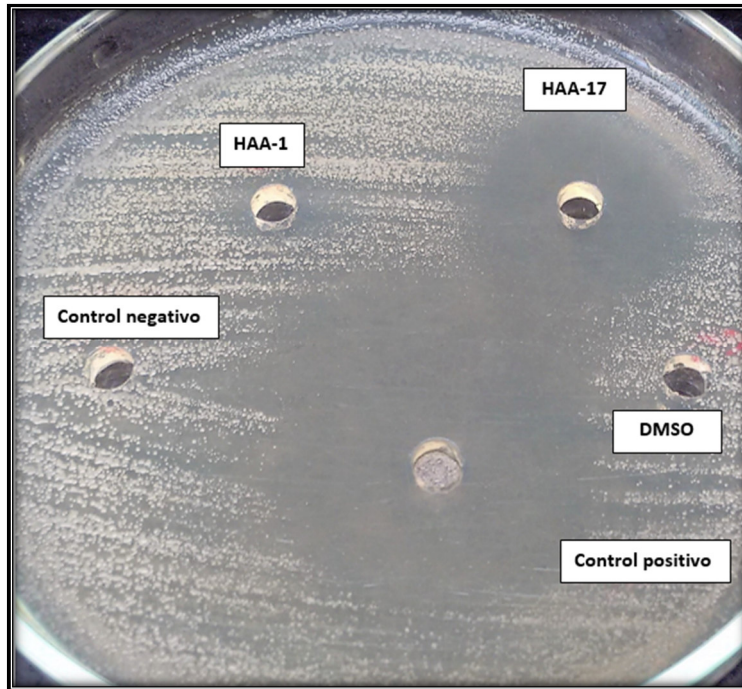


Figura 23. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo frente a *Candida albicans* ATCC 10231. **Control positivo:** Fluconazol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **Control negativo:** Acetato de etilo

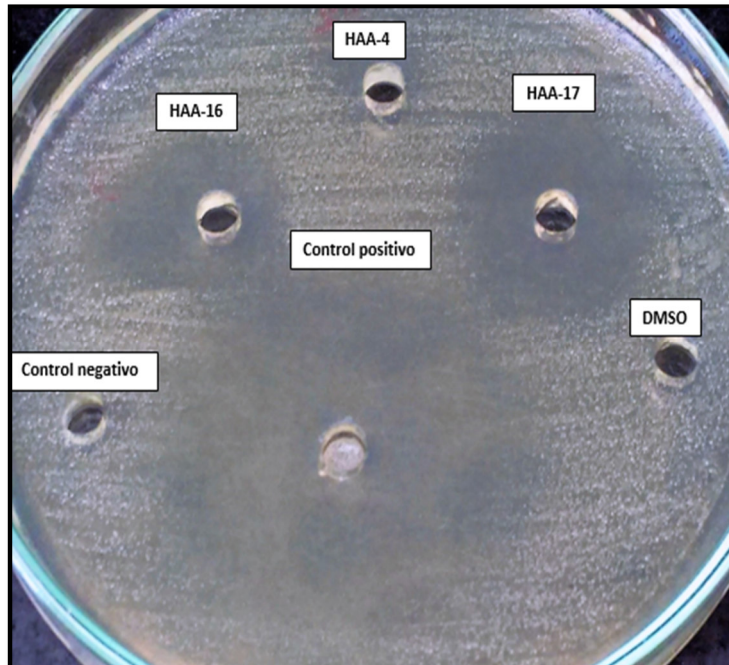


Figura 24. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos obtenidos con diclorometano frente a *Candida albicans* ATCC 98028. **Control positivo:** Fluconazol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **Control negativo:** Diclorometano

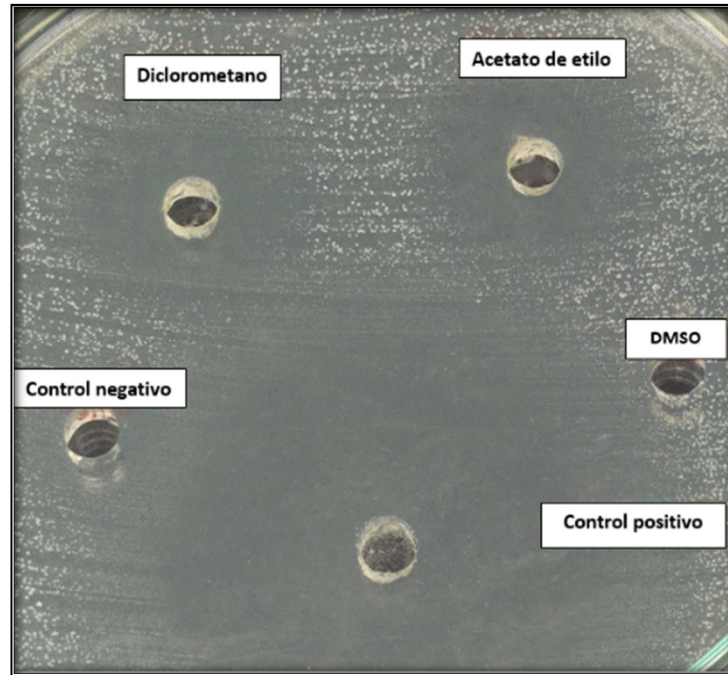


Figura 25. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-4 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Control positivo:** Ciprofloxacino (100 µg/mL). **Control negativo:** Solventes orgánicos

6.10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico activo

Las concentraciones de los extractos orgánicos de las cepas HAA-4, HAA-16 y HAA-17 fueron igualados a la concentración de 6.5 mg/mL. Los resultados del ensayo cuantitativo de la CMI de los extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 se encuentran en la **Tabla 9**. La CMI de los extractos orgánicos varió desde 3,25 mg/mL a 6,5 mg/mL frente a las levaduras del género *Candida*. Se determinó que *C. albicans* ATCC 7516 y *C. parapsilosis* ATCC 7307 presentaron una CMI de 3,25 mg/mL obtenido del extracto de acetato de etilo del actinomiceto HAA-17, por lo tanto, se les considera como los patógenos más sensibles del presente estudio por presentar la CMI más baja (**Figura 26**). Estos valores reflejan una síntesis de lo apreciado en las pruebas de screening, donde se evidencia una potente actividad antifúngica por parte de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17. Asimismo, cabe mencionar

que la evaluación de la CMI del extracto diclorometánico del actinomiceto HAA-4 frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. Faecalis*), no presentó actividad antimicrobiana; sin embargo, el extracto diclorometánico inhibió el crecimiento de *Candida albicans* solo en su primera concentración (6,5 mg/mL).

Tabla 9. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 y HAA-4, frente a levaduras del género *Candida*.

Actinomiceto	Solvente	CMI (mg/mL)				
		<i>C.albicans</i> ATCC 7516	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 7307	<i>C.tropicalis</i> ATCC 7206	<i>C.albicans</i> ATCC 98028	<i>C.albicans</i> ATCC 12031
HAA-16	Acetato de etilo	6,5	6,5	-	-	6,5
HAA-17	Acetato de etilo	3,25	3,25	6,5	6,5	6,5
HAA-4	Diclorometano	6,5	-	-	-	6,5

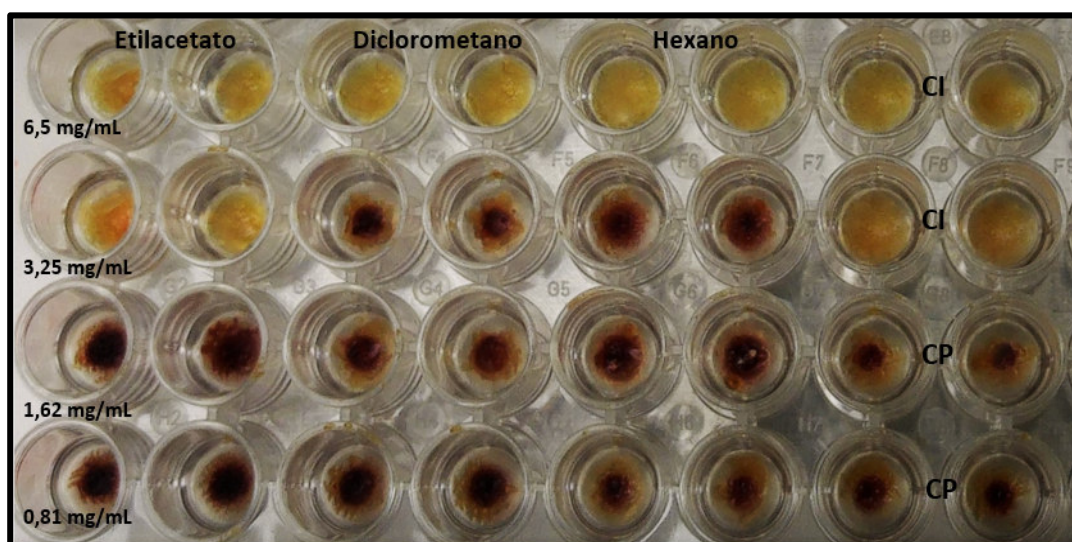


Figura 26. Prueba de CMI de los extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a *C. parapsilosis* ATCC 7307, usando cloruro de trifeníl tetrazolium (TTC) como revelador. **CI:** control de inhibición del patógeno. **CP:** control de crecimiento del patógeno

6.11. Identificación molecular de los actinomicetos seleccionados

El árbol filogenético obtenido reveló que la cepa denominada HAA-16 se encuentra estrechamente relacionada a *Streptomyces albidoflavus* con identidades de secuencias de 99% (**Figura 27**). Respecto a la cepa denominada como HAA-17, ésta se encuentra relacionada a *Streptomyces* sp ADI9602 con identidades de secuencias de 44%. Las agrupaciones se encuentran apoyadas por 1000 réplicas de Bootstrap. Por otro lado, respecto a la cepa HAA-4, ésta se encuentra localizada en una rama individual cercana al grupo formado por 5 actinomicetos (*Streptomyces celluloflavus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces pratensis*, *Streptomyces tsusimaensis* y *Streptomyces griseobrunneus*) (**Figura 27**). Sin embargo, el análisis mediante la herramienta BLAST reveló que la secuencia del ARNr 16S de HAA-4 presenta mayor grado de identidad de 99% con *Streptomyces griseobrunneus* y *Streptomyces pratensis*.

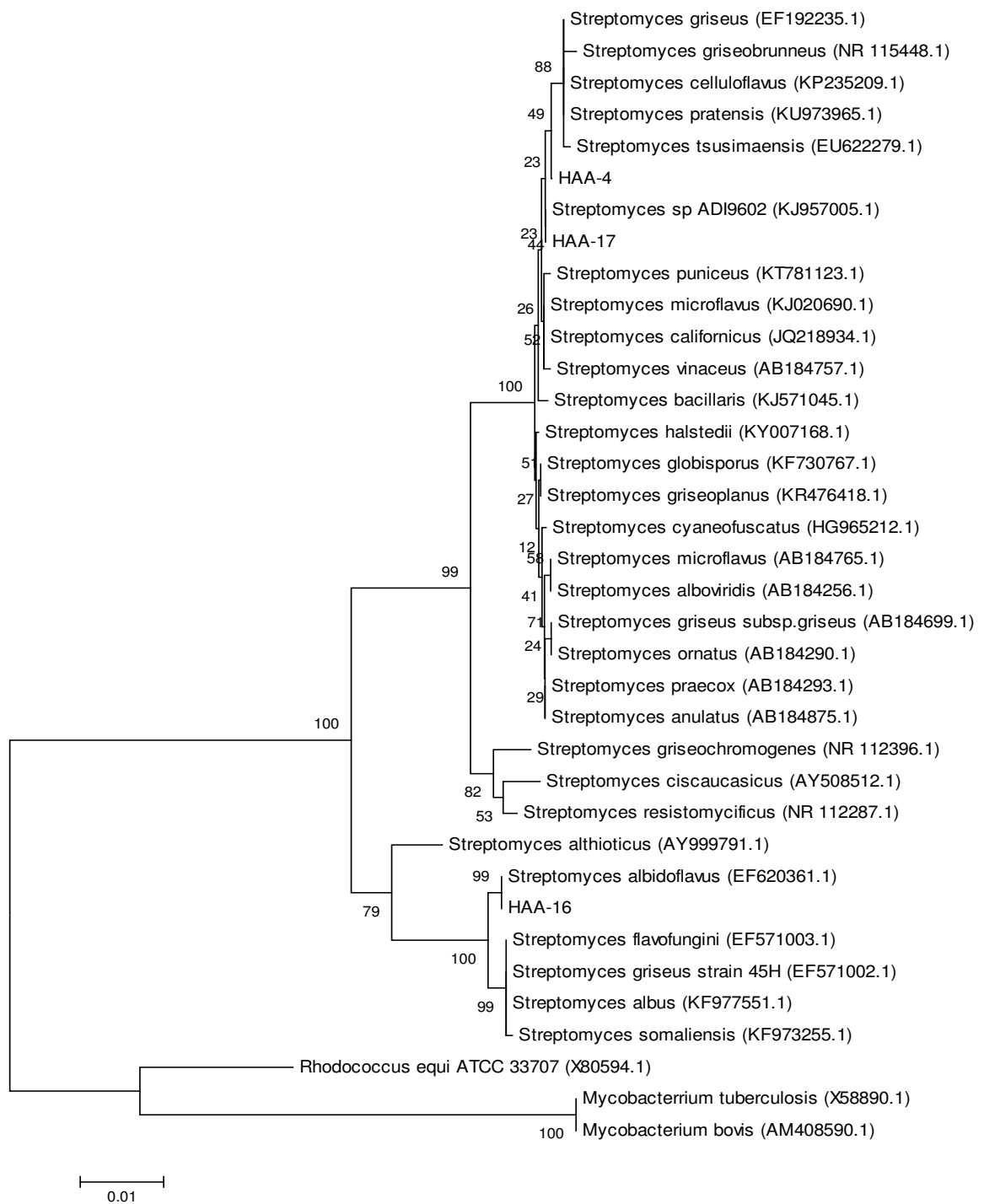


Figura 27. Árbol filogenético de las secuencias de ADNr 16S de las cepas de actinomicetos **HAA-4**, **HAA-16** y **HAA-17**. Se utilizó como grupo externo a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Rhodococcus equi*.

6.12. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos entre los extractos orgánicos de la cepa HAA-16 y las levaduras del género *Candida* presentaron diferencias significativas en la actividad inhibitoria puesto que el estadístico F lleva asociado un valor $p < 0,05$, lo cual indica que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición (**Tabla 10**).

Tabla 10. Resultados estadísticos de la prueba ANOVA de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-16 frente a levaduras del género *Candida*. gl (grados de libertad), F (estadístico de prueba), p (significancia observada)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Tipo de extractos	2618,800	3	872,933	52,038	,000
Levaduras del género <i>Candida</i>	268,400	16	16,775		
Total	2887,200	19			

Considerando la diferencia significativa entre los factores evaluados, las pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey demuestra que el extracto hexánico presenta la actividad inhibitoria más baja con respecto a su media (3,80 mm de inhibición, el cual difiere significativamente de los demás valores calculados) seguido del extracto de diclorometano (17,20 mm de inhibición) y finalmente el extracto de acetato de etilo (18,20 mm de inhibición), el cual presentó el mayor valor de media del diámetro de inhibición frente al crecimiento de las levaduras evaluadas. Estos resultados nos indican que los extractos de acetato de etilo y diclorometano de la cepa HAA-16 son los más representativos porque presentan la mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 1 y difiere significativamente de estos. Asimismo, se puede observar que el control positivo (Fluconazol) presenta la media de inhibición altamente

significativa frente a los patógenos del género *Candida*, en comparación al diámetro de inhibición observados con los extractos orgánicos evaluados (**Tabla 11**).

Tabla 11. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-16 frente a levaduras del género *Candida*) a: Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 5,000

	Tipo de extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey ^a	Hexano	5	3,80		
	Diclorometano	5		17,20	
	Acetato de etilo	5		18,20	
	Fluconazol - Control positivo	5			36,00
	Sig.		1,000	,980	1,000
Tukey B ^a	Hexano	5	3,80		
	Diclorometano	5		17,20	
	Acetato de etilo	5		18,20	
	Fluconazol - Control positivo	5			36,00

La **Tabla 12** presenta los resultados al analizar el efecto de los extractos orgánicos de la cepa HAA-16 sobre el crecimiento de las levaduras del género *Candida*, haciendo énfasis en el extracto de acetato de etilo el cual presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 18,20 mm con límites entre $15,51 \leq \mu \leq 20,89$ mm y el control positivo Fluconazol (36,00 mm) con límites entre $30,52 \leq \mu \leq 41,48$ mm. Para todos los extractos orgánicos evaluados excepto los de hexano, el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición se traslapan entre sí, es decir que comparten valores de inhibición.

Tabla 12. Intervalos generales de confianza al 95 % (Extractos orgánicos de la cepa HAA-16 frente a levaduras del género *Candida*)

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Acetato de etilo	5	18,20	2,168	,970	15,51	20,89	15	20
Diclorometano	5	17,20	3,834	1,715	12,44	21,96	12	22
Hexano	5	3,80	5,310	2,375	-2,79	10,39	0	11
Fluconazol (Control positivo)	5	36,00	4,416	1,975	30,52	41,48	30	41
Total	20	18,80	12,327	2,756	13,03	24,57	0	41

Asimismo, el patógeno que presentó mayor sensibilidad frente a los extractos orgánicos de la cepa HAA-16 fue *C. tropicalis* ATCC 7206 con un diámetro de halo de inhibición de 22 mm, seguido por *C. albicans* ATCC 98028 y *C. albicans* ATCC 7516, ambos con 20 mm, seguido de *C. albicans* ATCC 10231 con 19 mm y finalmente *C. parapsilosis* ATCC 7307 con un diámetro de inhibición de 17 mm (**Figura 28**).

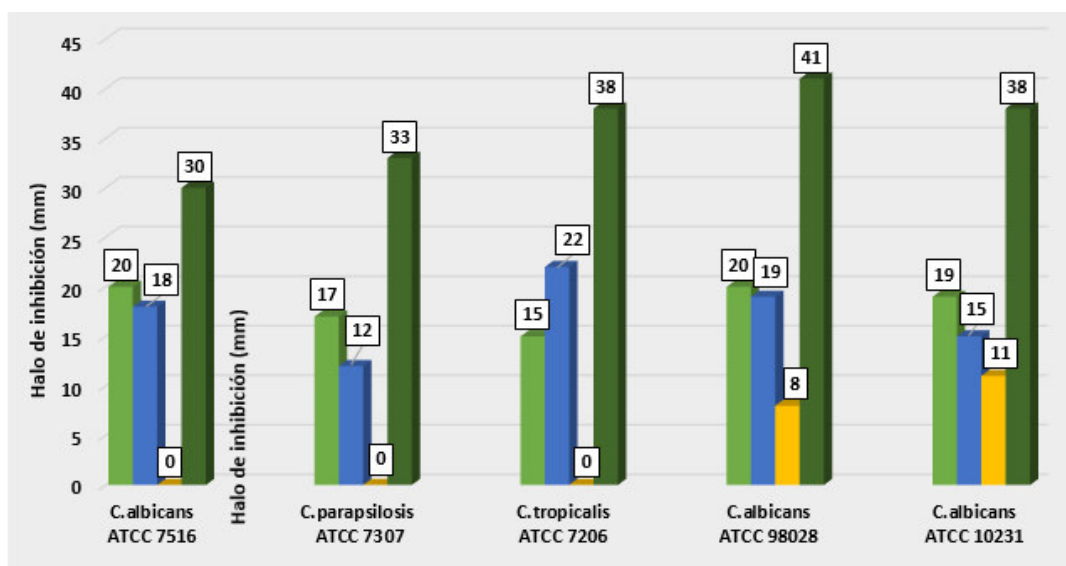


Figura 28. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-16 comparados con el Control positivo (Fluconazol) frente a las levaduras del género *Candida*.

Por otro lado, la prueba ANOVA de los extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a las levaduras del género *Candida*, determina que existen diferencias significativas de la actividad inhibitoria puesto que el estadístico F lleva asociado un valor $p < 0,05$.

Tabla 13. Resultados estadísticos de la prueba ANOVA de los extractos orgánicos del actinomiceto HAA-17 frente a levaduras del género *Candida*. gl (grados de libertad), F (estadístico de prueba), p (significancia observada)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tipo de extractos	2658,550	3	886,183	64,450	,000
Levaduras del género <i>Candida</i>	220,000	16	13,750		
Total	2878,550	19			

Considerando la diferencia significativa observada entre los factores evaluados, la prueba de medias de Tukey demuestra que el extracto orgánico de hexano presenta la actividad inhibitoria más baja con respecto a su media (5,60 mm de inhibición, el cual difiere significativamente de los demás valores calculados) seguido del extracto de diclorometano (15,00 mm de inhibición) y finalmente el extracto de acetato de etilo (26,80 mm de inhibición) presentó el mayor valor de media del diámetro de inhibición frente al crecimiento de las levaduras del género *Candida*. Estos resultados nos indican que el extracto de acetato de etilo de la cepa HAA-17 presenta la mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 1 y 2. Asimismo, se puede observar que el control positivo (Fluconazol) presenta la media de inhibición significativa frente a los patógenos del género *Candida*, en comparación al diámetro de inhibición observados con los extractos orgánicos evaluados (**Tabla 14**).

Tabla 14. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-17 frente a levaduras del género *Candida*) a: Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 5,000.

	Tipo de extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
HSD Tukey ^a	Hexano	5	5,60			
	Diclorometano	5		15,00		
	Acetato de etilo	5			26,80	
	Fluconazol - Control positivo	5				36,00
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Tukey B ^a	Hexano	5	5,60			
	Diclorometano	5		15,00		
	Acetato de etilo	5			26,80	
	Fluconazol - Control positivo	5				36,00

La **Tabla 15** presenta los resultados de los extractos orgánicos de la cepa HAA-17 sobre el crecimiento de las levaduras del género *Candida*, haciendo énfasis en el extracto de acetato de etilo que presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 26,80 mm con límites entre $24,11 \leq \mu \leq 29,49$ mm y el control positivo Fluconazol (36,00 mm) con límites entre $30,52 \leq \mu \leq 41,48$ mm. Para todos los extractos orgánicos evaluados excepto los de hexano, el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición no se traslapan entre sí, es decir no comparten valores de inhibición.

Tabla 15. Intervalos de confianza al 95 % (Extractos orgánicos de HAA-17 frente a levaduras del género *Candida*)

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Acetato de etilo	5	26,80	2,168	,970	24,11	29,49	24	30
Diclorometano	5	15,00	1,871	,837	12,68	17,32	13	18
Hexano	5	5,60	5,225	2,337	-,89	12,09	0	11
Fluconazol (Control positivo)	5	36,00	4,416	1,975	30,52	41,48	30	41
Total	20	20,85	12,309	2,752	15,09	26,61	0	41

Asimismo, se comprobó que el extracto de acetato de etilo de HAA-17 presentó mayor actividad inhibitoria frente las 5 levaduras, además se determinó que el patógeno con mayor sensibilidad fue *C. parapsilosis* ATCC 7307 con un diámetro de halo de inhibición de 30 mm, seguido por *C. albicans* ATCC 7516 y *C. albicans* ATCC 10231 ambas con 27 mm, *C. albicans* ATCC 98028 con 26 mm y finalmente *C. tropicalis* ATCC 7206 con un diámetro de 24 mm (**Figura 29**).

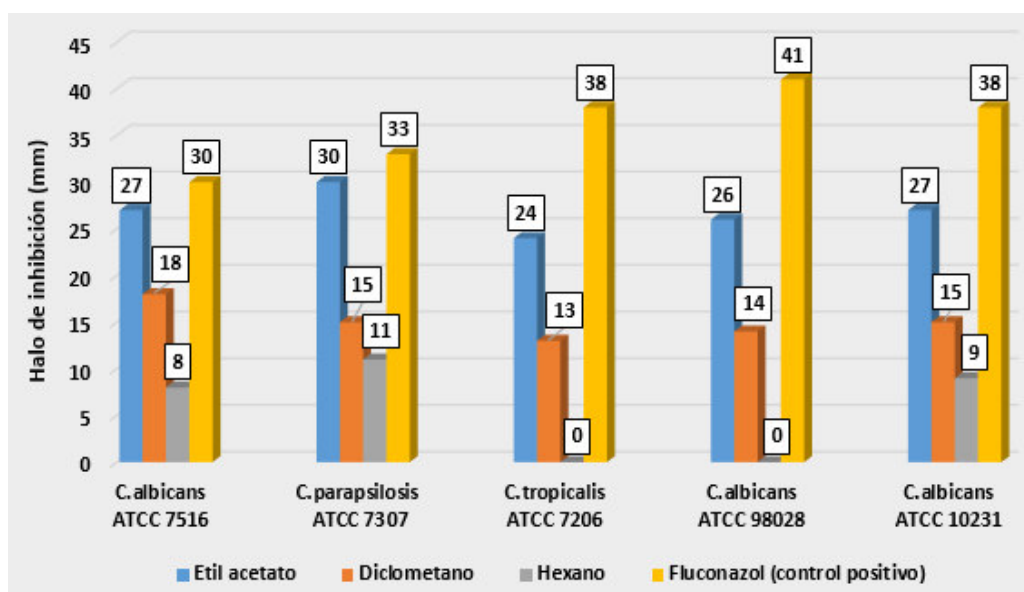


Figura 29. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de HAA-17 comparados con el Control positivo (Fluconazol) frente a las levaduras.

Los análisis de varianzas de los extractos orgánicos de la cepa HAA-4 frente a las bacterias (*S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 51922) y las levaduras (*C. albicans* ATCC 7516 y *C. albicans* ATCC 10231), determinaron que las interacciones entre los factores poseen efectos significativos sobre los diámetros de los halos de inhibición puesto que el estadístico F lleva asociado un valor $p < 0,05$. Por lo tanto, mediante las pruebas de comparaciones Tukey entre los diámetros de inhibición de los extractos de acetato de etilo y diclorometano de la cepa HAA-4 frente a bacterias Gram positivas y levaduras; se determinó que los extractos orgánicos presentan valores bajos con respecto a sus medias (9 mm y 13,50 mm de inhibición respectivamente); éstos difieren significativamente de las medias de inhibición de los controles positivos (Ciprofloxacino para Gram positivas y Fluconazol para las levaduras) (**Tabla 16**).

Tabla 16. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Extractos orgánicos de la cepa HAA-4) a: Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 5,000.

	Tipo de extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey ^a	Acetato de etilo	4	9,00	
	Diclorometano	4	13,50	
	Control positivo	4		33,75
	Sig.		,196	1,000
Tukey B ^a	Acetato de etilo	4	9,00	
	Diclorometano	4	13,50	
	Control positivo	4		33,75

7. DISCUSIÓN

En la actualidad, la multirresistencia antibiótica pone en peligro el tratamiento de un número creciente de enfermedades infecciosas. Es por ello, que se ha buscado alternativas para su control, una de ellas es mediante el uso de microorganismos como bacterias y hongos (Busti 2006). Gracias a la participación de actinomicetos productores de metabolitos bioactivos es posible contrarrestar algunos de estos patógenos emergentes. Así tenemos que especies del género *Streptomyces* son considerados modelos en la producción de nuevas y prometedoras moléculas antimicrobianas (Lehr *et al.* 2008). Los actinomicetos son organismos ubicuos en la naturaleza, la mayoría resulta ser abundante en suelos; sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos, así como también asociados a insectos (Leiva *et al.* 2004, León *et al.* 2007).

La asociación tripartita entre los actinomicetos, las hormigas cortadoras de hojas y el hongo *Leucocoprinus* sp., proporcionan una nueva vía para la identificación, producción y aplicación de antibióticos para el tratamiento de algunas enfermedades tanto en seres humanos como en otros organismos (Currie *et al.* 1999). La necesidad latente de protección de los cultivos de las colonias frente a la amenaza constante de invasores patógenos ha influenciado al parecer en el desarrollo de una simbiosis mutualista con los actinomicetos (Taerum *et al.* 2007). Las hormigas son un sustrato vivo rico en quitina, por tanto, los actinomicetos son capaces de colonizar su exoesqueleto ya que provienen del suelo donde está establecida la colonia. Por lo tanto, su diversidad tanto de género como especie está relacionada con su abundancia y proliferación en suelos ricos cuya materia orgánica es proporcionada por la actividad de la colonia (Sialer *et al.* 2008).

Los actinomicetos del presente estudio fueron aislados a partir de *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758); sin embargo, cabe mencionar que estas bacterias no solo están asociadas a *A. cephalotes*. Haeder *et al.* (2009) aislaron y caracterizaron 19 cepas de

actinomicetos asociados a tres especies de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* (*A. octospinosus* (Reich, 1793), *A. echinatio* (Forel, 1899) y *A. volcanus* (Wheeler, 1937) recolectadas en Panamá. Sánchez *et al.* (2011) aislaron 29 cepas de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras del género *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, y *Trachymyrmex*.

En el presente estudio, el aislamiento primario de los actinomicetos a partir de *Atta cephalotes* fue mayor en el medio de cultivo Agar Almidón Caseína (80%) en comparación al Agar Czapeck (20%). Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez *et al.* (2011) quienes utilizaron solo el medio de cultivo Agar Almidón Caseína suplementado con glicerol (como fuente de carbono) para el aislamiento primario, obteniendo 29 cepas de actinomicetos asociados a diferentes especies de hormigas cortadoras de hojas recolectadas en México. Por otro lado, el pretratamiento de las muestras en calor fue eficaz para restringir el crecimiento de la microbiota acompañante, ya que en la mayoría de los cultivos se obtuvo colonias puras de actinomicetos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Ranjan *et al.* (2015) quién además del calor aplicó tratamientos con fenol y posterior cultivo en Agar quitina.

Los métodos de aislamiento convencionales han demostrado que por lo menos el 90% de los actinomicetos aislados del suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Manteca & Sanchez 2010). En el AAC los actinomicetos iniciaron su crecimiento generalmente a partir de 5-7 días de incubación hasta los 21 días. Estas bacterias formaron colonias de tamaño variable (desde 1 mm hasta colonias de 12 mm de diámetro). Asimismo, se pudo observar que existe una variedad morfológica de colonias, siendo las más frecuentes las de forma circular, borde liso e irregulares, consistencia dura y aspecto pulverulento. En el presente estudio, las colonias fueron entre blanco-grisáceas, pulverulentas y sin pigmentación en superficie; características que predominaron sobre las demás variedades de colonias; sin embargo, la pigmentación del micelio vegetativo de cada colonia fue variable entre el marrón y amarillo.

Nuestro resultados son similares a los de Barke *et al.* (2010) quienes aislaron actinomicetos a partir de *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793) donde las colonias presentaron características semejantes a las de nuestro estudio tales como superficies pulverulentas, colonias con surcos alrededor y la producción de pigmentos. Es importante mencionar que en el aislamiento a partir de *A. octospinosus* (Reich, 1793) se emplearon medios de cultivos diferentes a los empleados en el presente estudio y por consiguiente las características fisiológicas pueden variar en función a los nutrientes disponibles y las condiciones físicas del medio en el que se encuentren, siendo éstas determinantes en la identificación a nivel de género (Vijayakumar *et al.*, 2010).

Las observaciones microscópicas de los aislamientos mediante los microcultivos evidenciaron comportamientos culturales característicos del género *Streptomyces* puesto que mostraron células filamentosas y finamente ramificadas con abundantes esporas alrededor. Por lo tanto, la caracterización cultural y microscópica siguen siendo parámetros a tomar en cuenta en la identificación de los actinomicetos. En contraste Horna & Sialer (2003) aislaron un total de 240 cepas de *Streptomyces* sp. de las cutículas de hormigas pertenecientes a la especie *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793); estos resultados son mayores a los encontrados en el presente estudio debido a que se realizaron 60 muestreos a partir de cuatro nidos de diferentes especies. Pero no solo el género *Streptomyces* está asociado a las hormigas cortadoras de hojas, tal como lo reportan Zucchi *et al.* (2011) quienes aislaron 20 cepas de actinomicetos asociados a *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Forel, 1912) de los cuales 17 correspondieron a 10 especies diferentes de *Streptomyces* sp., y las otras 3 a *Pseudonocardia antártica* (Prabahar, 2004), *Kitasatospora paranensis* (Omura, 1983) y *Propionicimonas paludícola* (Akasaka, 2003). Asimismo, Oh *et al.* (2009) aislaron actinomicetos del género *Pseudonocardia* asociado con las atinas menores de *Apterostigma detigerum* (Wheeler, 1925) mientras que Remya & Ramasamy (2008) aislaron 62 colonias de actinomicetos y lograron identificar 30 cepas del género *Streptomyces*, 10 de

Glicomyces, 7 de *Nocardiopsis*, 4 de *Nocardíodes*, 3 de *Actinopolispora*, 3 de *Nocardia*, 2 de *Kibdelosporangium*, 1 de *Actinosinnema*, 1 de *Kineosporia* y 1 de *Saccharopolyspora*.

Complementariamente, dentro de las características específicas, los actinomicetos presentan una actividad metabólica alta, produciendo enzimas extracelulares hidrolíticas y lignolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo (Ezziyani *et al.* 2004). La mayoría de los aislados resultaron ser productores de algún tipo de enzima extracelular; prioritariamente se evidencia un alto porcentaje en la producción de lecitinasas (67%) seguido de caseinasas (63%), amilasas (57%), esterases (53%) y por último la producción de gelatinasas (40%). En contraste, León *et al.* (2016), encuentran porcentajes bajos en la producción de lecitinasas (37%) pero altos porcentajes en la producción de gelatinasas (81%), valores contrarios a los obtenidos en el presente estudio, aunque el origen de los actinomicetos proviene de fuentes marinas. Asimismo, Medina & Evangelista (2011) aislaron actinomicetos provenientes del suelo donde también se determinó altos porcentajes en la producción de gelatinasas.

Los actinomicetos se consideran los organismos dominantes en la descomposición del suelo, en especial, el género *Streptomyces* ha sido descrito como un microorganismo productor de enzimas extracelulares entre las que se encuentran las proteasas o amilasas, por tanto, son catalogados como agentes antagonistas prometedores para el biocontrol, debido a la reacción de hidrólisis que catalizan estas enzimas sobre el micelio de los hongos en suelos ácidos y hojarasca (Gomes *et al.* 2001). En el presente estudio se evidencia la presencia de numerosas cepas productoras de enzimas extracelulares con actividad multienzimática asociadas a hormigas cortadoras de hojas poco exploradas. Estas propiedades podrían ser aprovechadas para una posible o eventual explotación biotecnológica ya que los actinomicetos nos demuestran que cumplen un

papel importante en el reciclaje del material orgánico del suelo al segregar distintos tipos de exoenzimas (Goodfellow & Williams 1983). Además; desde el punto de vista industrial, estas enzimas podrían ser utilizadas en la industria de los alimentos, farmacéutica, detergentes, panadería y papelería (León *et al.* 2007).

En lo que respecta a la determinación de los actinomicetos con actividad antimicrobiana, se encontró que un gran número de las cepas aisladas presentaron actividad inhibitoria en mayor o menor grado contra todas las cepas probadas; algunas fueron específicas sobre un grupo de patógenos, pero otras presentaron una mayor cobertura de acción, inhibiendo tanto a bacterias como levaduras. El método de doble capa fue efectivo para la evaluación cualitativa de antagonismo bacteriano, el cual se realizó con éxito en el medio Agar Almidón Caseína. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Al-zahrani (2007), quien evaluó la actividad antagonista de *Streptomyces sp.* frente a bacterias, levaduras y hongos fitopatógenos; obteniendo mejores resultados en los medios Agar Almidón Caseína (bacterias y levaduras), Agar Sabouraud Dextrosa y Agar avena (hongos). Asimismo, en el trabajo de Medina y Evangelista (2011) se utilizó el método de doble capa para evaluar 23 actinomicetos frente a bacterias y levaduras testigo; evidenciando una marcada actividad frente a organismos Gram positivas (76%) y una mediana actividad frente a bacterias Gram negativas (48%) y *Candida albicans* (17%). Caso contrario se observa en el presente trabajo, donde se muestra una marcada actividad frente a levaduras del género *Candida* (53%), mediana actividad frente a bacterias Gram positivas (17%) y baja actividad frente a bacterias Gram negativas (7%). La marcada diferencia de actividad frente a *Candida sp.* es consistente con lo reportado con Barke *et al.* (2010) quienes proponen que los actinomicetos asociados a la tribu Attini, se han desarrollado para promover el tipo correcto de compuestos según la competencia bacteriana y/o antifúngica, proporcionando la combinación adecuada de recursos antimicrobianos. Por tanto, la producción de múltiples compuestos antifúngicos, los hace útiles y atractivos para las hormigas como mutualistas.

Por otro lado, es importante resaltar que con frecuencia se evidencia en diversas investigaciones que la inhibición de microorganismos Gram positivos a diferencia de los Gram negativos es más sencillo, esto debido a que los Gram negativos presentan una compleja estructura en su pared celular y, además, porque poseen eficientes mecanismos de resistencia que neutralizan la acción de los antibacterianos producidos por actinomicetos (León *et al.* 2011).

Los compuestos bioactivos son extraídos por medio de varias técnicas. La extracción con solventes orgánicos se emplea generalmente para la extracción de metabolitos secundarios a partir de cultivos filtrados (Selvameenal *et al.* 2009). Por lo tanto, los microorganismos seleccionados para este proceso fueron las cepas HAA-16 y HAA-17 por presentar la mayor actividad antifúngica y la cepa HAA-4 debido a su amplio espectro de acción frente a bacterias y levaduras. Este espectro de acción puede significar que el agente activo no es muy específico en cuanto a su diana, ya que actúa igualmente sobre bacterias y levaduras, o bien que esta cepa elabore más de un producto, cada uno de los cuales puede tener un sitio blanco específico distinto.

Para poder obtener los compuestos bioactivos de los actinomicetos, se esperó la fase estacionaria en los cultivos continuos ya que la producción de antibióticos usualmente ocurre en esta fase y además porque la producción de antibióticos forma parte de la transición de las células vegetativas a propágulos en los actinomicetos (Augustine *et al.* 2005, Duque & Quintana 2008).

El crecimiento correcto de estas bacterias está determinado por la presencia de pellets, esta característica es debido a que los actinomicetos son bacterias aerobias, por tanto, la baja concentración de oxígeno en el sistema condiciona el crecimiento y ocasiona la forma de auto agregación que sirve como soporte para poder desarrollar los filamentos y esporas y obtener la suficiente biomasa microbiana y la producción de metabolitos secundarios (Papagianni 2004). Cabe mencionar que antes de estudiar la naturaleza de los compuestos antimicrobianos, fue necesario confirmar que estos se encuentran en los sobrenadantes; por tanto, se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la prueba

en pocillos en el que se determinó la capacidad antimicrobiana frente a bacterias y levaduras confirmando su potencial inhibitorio.

Una vez corroborada la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas seleccionadas, estos se sometieron a un tamizaje secundario para la extracción de los compuestos bioactivos. Se utilizaron solventes de polaridades distintas tales como el diclorometano, acetato de etilo y hexano. La polaridad es una característica muy importante de los solventes debido a que determina la solubilidad (Vijayakumar *et al.* 2010). Los extractos orgánicos crudos se caracterizan por ser una mezcla de muchas sustancias que en ocasiones generan reacciones antagónicas en los compuestos activos, por lo cual también se puede observar la misma intensidad de la bioactividad a cualquier concentración del extracto (De Silvestre *et al.* 1994).

Se eligió el método de difusión en pocillos porque es un método que, a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad del extracto facilitando la evaluación del potencial antimicrobiano como lo afirman Rojas *et al.* (2005) quienes señalan que el método de pocillos en agar es más sensible que el método Kirby- Bauer (discos en papel); por tanto, recomiendan este método para realizar ensayos de actividad antimicrobiana bajo condiciones estandarizadas. Los controles utilizados fueron: el Ciprofloxacino como control positivo bacteriano debido a que es un antibiótico de amplio espectro, activo contra las bacterias Gram positivo y Gram negativo; y el Fluconazol como control fúngico ya que posee actividad frente a la mayoría de las especies del género *Candida*, además de su excelente biodisponibilidad y baja toxicidad (Mengana *et al.* 2012).

Respecto a los solventes orgánicos utilizados en el presente trabajo se observaron variaciones en la recuperación de los extractos crudos. Se determinó que el acetato de etilo seguido del diclorometano, fueron los solventes de mayor rendimiento y los más efectivos en cuanto a la inhibición del crecimiento de los patógenos se refiere, mientras que el hexano presentó bajo rendimiento.

Los extractos orgánicos de la cepa HAA-4 fueron evaluados frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Candida albicans*; evidenciándose actividad inhibitoria de los extractos orgánicos (diclorometano y acetato de etilo) frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y *Candida albicans*. Cabe mencionar que los extractos diclorometánicos de la cepa HAA-4 presentaron la mayor capacidad de retención de metabolitos secundarios en comparación a los de acetato de etilo. Éste es un resultado importante considerando que las cepas de *S. aureus* poseen gran facilidad para mutar e incorporar genes de resistencia frente a los antibióticos tradicionales (Walker & Aguilar 2000). Además, se tiene que tener en cuenta que, en la actualidad, estos microorganismos son los principales causantes de infecciones nosocomiales, debido a su amplia distribución, pues forma parte de la flora normal de mucosas y piel y poseen numerosos factores de virulencia como lo reportan Reimer *et al.* (1997) y Rojas *et al.* (2008). Además, cabe resaltar la sensibilidad de *C. albicans* frente a los extractos de acetato de etilo y diclorometano, ya que para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por esta levadura los principales inconvenientes se deben a la escasez de antimicóticos; esto obedece a la tendencia tóxica de los antimicóticos comerciales para los humanos debida a la similitud que conservan los hongos con las células eucarióticas (Walker & Aguilar 2000). Un trabajo similar al presente estudio fue presentado por Mendes *et al.* (2013) quienes evaluaron extractos orgánicos de acetato de etilo de actinomicetos asociados a hormigas del género *Trachymyrmex* frente a *Candida albicans*, obteniendo resultados favorables. La resistencia de las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) a los extractos orgánicos está dada por la composición estructural de su pared celular que actúa como una barrera para muchas sustancias medioambientales y antibióticos según Murray *et al.* (2007) y Koneman *et al.* (2008). En base a lo expuesto, es posible que la actividad inhibitoria sobre los microorganismos evaluados no solo está determinada por un único principio activo, sino que existe un efecto sinérgico entre varios de ellos. Además, se tiene que tomar en consideración que el rendimiento de los

extractos puede variar dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos y la polaridad del solvente utilizado.

Trabajos similares indican que es necesario probar varios solventes orgánicos y diversos patógenos indicadores. Leiva *et al.* (2004), seleccionaron 13 cepas de un total de 31 actinomicetos aislados de sedimento marino para obtener 5 extractos con solventes de polaridad creciente; éstos fueron éter de petróleo, cloroformo, etilmetilacetona, acetato de etilo y butanol; siendo los extractos más activos los obtenidos con etilmetilcetona y acetato de etilo. Asimismo, Remya & Ramasamy (2008) utilizaron extractos de acetato de etilo, metanol, cloroformo y etanol frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*; siendo el extracto de acetato de etilo el de mayor capacidad de inhibición.

Por otro lado, los resultados del enfrentamiento de los extractos orgánicos de los actinomicetos HAA-16 y HAA-17 corroboran su gran potencial antifúngico contra las levaduras del género *Candida*, alterando su permeabilidad y la pérdida de sus elementos intracelulares esenciales (Clancy *et al.* 2005). Los extractos de acetato de etilo mostraron una actividad antifúngica máxima contra las levaduras del género *Candida* seguido por los extractos diclorometánicos. Asimismo, cabe recalcar que el extracto de acetato de etilo de la cepa HAA-17 presentó el mayor halo de inhibición de 30 mm de diámetro frente a *C. parapsilosis* ATCC 7307, mientras que el extracto diclorometánico presentó mayor halo de inhibición de 22 mm de diámetro frente a *C. tropicalis* ATCC 7206. Estos valores son muy cercanos a los del control positivo (Fluconazol 20 µg/mL) quien presentó halos de inhibición de 33 mm de diámetro frente a *C. parapsilosis* ATCC 7307 y 38 mm frente a *C. tropicalis* ATCC 7206. Esta diferencia se debe a que los antifúngicos utilizados en la industria farmacéutica están altamente concentrados y purificados mientras que los extractos probados en este estudio contienen una mezcla de metabolitos bioactivos que pueden interactuar individual o sinérgicamente en el enfrentamiento; por tanto, mientras mayor sea el fraccionamiento

de los componentes mayor será la actividad antimicrobiana (Challis & Hopwood 2003). Así tenemos a Narayana *et al.* (2008) quienes separaron 4 fracciones bioactivas del extracto crudo de acetato de etilo de *Streptomyces* sp. y lo enfrentaron a diversos microorganismos, entre ellos hongos fitopatógenos, obteniendo máximos resultados de inhibición frente a todos los microorganismos evaluados. En este sentido, nuestros resultados ratifican al acetato de etilo como uno de los mejores solventes en la recuperación de metabolitos bioactivos de actinomicetos, tal como lo refieren Palaniappan *et al.* (2013) al destacar la mejor capacidad de los solventes polares para concentrar metabolitos secundarios.

En el presente estudio el extracto de acetato de etilo de la cepa HAA-17 presentó valores entre 3,25 – 6,5 mg/mL de CMI frente a las levaduras del género *Candida*, siendo estos valores menores a los obtenidos con los extractos diclorometánicos y hexánicos. En el trabajo presentado por Mendes *et al.* (2013) se evaluaron extractos de acetato de etilo a partir de la cepa *Streptomyces* TD025, asociada a la cutícula de hormigas del género *Trachymyrmex* frente a candidas, los cuales presentaron valores entre 10 - 100 µg/mL de CMI; valores aún menores a los obtenidos en el presente estudio.

Respecto a los análisis moleculares; teniendo en cuenta que una identidad mayor o igual a 99% es el criterio utilizado para identificar un organismo a nivel de especie, y que una identidad mayor o igual a 97% identifica un organismo a nivel de género (Drancourt *et al.* 2000); se evidenció que las tres cepas seleccionadas corresponden a especies del género *Streptomyces*, confirmando lo señalado a partir de las observaciones morfológicas; además, estas cepas se han descrito previamente como productoras de diversos metabolitos secundarios con actividad biológica. Por ejemplo, se ha demostrado que *Streptomyces albidoflavus*, el cual se relaciona con la cepa HAA-16 produce un compuesto antifúngico conocido como polihidroxi poliéter no proteico lo que indica que es un antibiótico no poligénico (Augustine *et al.* 2005). Además *S. albidoflavus* produce compuestos bioactivos con actividad antagonista a patógenos fúngicos de plantas, con lo cual es importante para el control biológico

(Zhou *et al.* 2014). Por otro lado, se ha demostrado que *S. albidoflavus* produce un compuesto bioactivo denominado dibutilftalato, el cual presenta una fuerte actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos unicelulares y filamentosos y además, se ha demostrado que éste compuesto se utiliza como un proliferado de peroxisoma, un compuesto efectivo contra la dermodicidosis y como un agente de canalización de fármacos importante para el estudio de la fisiología celular (Roy *et al.* 2006).

La cepa HAA-4 presentó una relación muy cercana con *S. griseobrunneus* y *S. pratensis*, ambos actinomicetos productores de diversos compuestos bioactivos. Así tenemos que *S. griseobrunneus* produce compuestos antibacterianos tales como aminoglucósidos, relacionados con la estreptomicina, además de cefalexina y oxohexaeno (Hemashenpagam 2011); mientras que para *S. pratensis* se han reportado componentes con propiedades antibacterianas y antitumorales (Rashad *et al.* 2015).

Por otro lado, no hay reportes sobre el estudio de la actividad biológica de la cepa *Streptomyces sp* ADI96-02, relacionada con la cepa HAA-17. Por otro lado, cabe mencionar que a partir del secuenciado del gen ARNr 16S se logró identificar a las cepas seleccionadas como miembros del género *Streptomyces*. Sin embargo, se necesita realizar pruebas complementarias de caracterización molecular a nivel de especie. Una de ellas podría ser la evaluación de marcadores moleculares específicos o utilizando la secuencia parcial del gen de la subunidad β del ARN polimerasa (*rpoB*), que según bibliografía posee ventajas sobre el gen ARNr 16S, ya que tiene una sola copia en el genoma mientras que el gen ARNr 16S es un gen de copias múltiples y aunque es poco frecuente, se ha informado que el 6.9% de las especies de *Streptomyces* poseen múltiples copias de este gen con diferentes secuencias (Kim *et al.* 2004). Las pruebas moleculares complementarias mencionadas líneas arriba, más la caracterización fenotípica y fisiológica, permiten esclarecer las relaciones filogenéticas de las cepas seleccionadas y brindan un resultado más preciso en la determinación de la especie.

Estos resultados son prometedores si se considera que los antimicóticos de uso clínico son escasos, las candidiasis y micosis causadas por hongos dematiáceos constituyen enfermedades emergentes y en general tienen creciente importancia como agentes oportunistas en pacientes inmunocomprometidos e incluso inmunocompetentes, a lo cual hay que agregar el incremento de la resistencia al escaso número de antifúngicos existentes (Pujol *et al.* 2000). En este aspecto, desde hace algunos años se está buscando organismos que produzcan un compuesto que tenga la capacidad de actuar contra bacterias resistentes a antibióticos o antifúngicos (Ceylan *et al.* 2008). Según la literatura consultada, el género *Streptomyces* es el principal responsable en la producción de la mayoría de los metabolitos bioactivos (Baltz 2006). Esto sugiere que algunas cepas pueden producir más de un compuesto con actividad antimicrobiana. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado y actualmente existe una expansión en el uso de actinomicetos como agentes de control biológico (Gonzalez-Franco & Robles 2009).

Los resultados del presente estudio son prometedores si se considera que hoy en día se requieren compuestos novedosos que actúen sobre las cepas patógenas que han desarrollado resistencia a los antibióticos usados en la actualidad, trátase de bacterias o levaduras. En este sentido se hace necesario realizar la caracterización de los compuestos bioactivos contenidos en los extractos de acetato de etilo y diclorometano, así como también los ensayos de bioactividad respectivos.

8. CONCLUSIONES

- Hay por lo menos 30 cepas de actinomicetos presentes en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758), recolectadas en las zonas verdes aledañas del distrito Mariano Dámaso Beraún – Huánuco, Perú.
- Se identificó a las cepas seleccionadas como especies del género *Streptomyces*.
- La mayoría de los actinomicetos aislados presentaron actividad antifúngica frente por lo menos a una levadura del género *Candida*, siendo *Candida albicans* ATCC 7516 la levadura más sensible frente a los actinomicetos.
- La cepa denominada como HAA-4 presentó mayor espectro de acción frente a bacterias y levaduras patógenas de importancia clínica.
- El extracto orgánico obtenido con acetato de etilo a partir del actinomiceto HAA-17 presentó la mayor actividad antifúngica frente a *Candida parapsilosis* ATCC 7307, mientras que el extracto diclorometánico presentó mayor rendimiento frente a *Candida tropicalis* ATCC 7206.
- La Concentración Mínima Inhibitoria más destacada fue la del extracto orgánico de acetato de etilo de la cepa HAA-117 con una concentración de 3.25 mg/mL frente a *Candida albicans* ATCC 7516 y *Candida parapsilosis* ATCC 7307.

9. RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas para la búsqueda específica de compuestos con actividad antimicrobiana, para lo cual se propone ensayar con patógenos intrahospitalarios.
- Evaluar otros solventes orgánicos con diferentes polaridades.
- Evaluar marcadores moleculares específicos o la secuencia parcial del gen rpoB para determinar el nivel de especie de los actinomicetos aislados.
- Realizar estudios dirigidos a la separación e identificación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos orgánicos de acetato de etilo de los actinomicetos con buena actividad antifúngica y así determinar su mecanismo de acción.
- Determinar la eficacia y/o toxicidad de los compuestos activos en modelos in vivo con el fin de determinar la estabilidad del extracto obtenido frente a agentes físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana y/o antifúngica descrita en el presente trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A. & N. Mathur. 2016. Thermophilic actinomycetes are potential source of novel bioactive compounds: A Review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 3(2): 130-138.
- Alonso L.E. 2010. Ant Conservation: Current status and a call to action. In: L. Lach, C. Parr and K. Abbott, eds. *Ant Ecology*. Oxford University Press, New York, USA. Pp. 59-74.
- Altschup S.F., W. Gish, W. Miller, et al. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Álvarez F., P. Olaechea, M. Palomar, et al. 2010. Epidemiología de las bacteriemias primarias y relacionadas con catéteres vasculares en pacientes críticos ingresados en servicios de medicina intensiva. *Medicina Intensiva* 34(7): 437-445.
- Al-Zahrani S.H.M. 2007. Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Jazan. *Science Journal of King Abdulaziz University* 19(1): 127-138.
- Anderson A. & E. Wellington. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3): 797-814. <http://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>
- Anglada M., A. Saluso, O. Ermácora, et al. 2013. Hormigas podadoras: Estudios bioecológicos y alternativas de manejo en sistema agrícolas y vegetación de Monte en entre Ríos. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 3(3).
- Ariniello L. 1999. Fungus-farming ants ensure crop survival with surprising strategies and partnerships. *BioScience* 49(10): 760-763.
- Augustine S., S. Bhavsar & B. Kapadnis. 2005. A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *Journal de Biociencias* 30(2): 201-211.
- Baltz R. 2006. Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration?. *Journal Indian Microbiology Biotechnology* 33(7): 507-513.

- Barke J., R. Seipke, S. Gruschow, et al. 2010. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology* 8(1): 109.
- Bergey D. & J. Holt. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins. 787pp.
- Bezděčková K., P. Bezděčka & I. Machar. 2015. A checklist of the ants (Hymenoptera: Formicidae) of Perú. *Zootaxa* 4020(1): 101-133. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4020.1.4>
- Bonifaz A. & T. Alexandro. 2012. *Micología médica básica*. McGraw-Hill Interamericana editores. 583pp.
- Bot A.N.M., D. Ortius-Lechner, K. Finster, et al. 2002. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux* 49(4): 363-370. <http://doi.org/10.1007/PL00012660>
- Busti E., P. Monciardini, L. Cavaletti, et al. 2006. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology* 152(3): 675-683. <http://doi.org/10.1099/mic.0.28335-0>
- Ceylan O., G. Okmen & A. Ugur. 2008. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsian Journal of BioSciences* 2(9): 73-82.
- Challis G. & D. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(2): 14555-14561. <http://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>
- Champness W.C. & K.F. Chater. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. In: P. Piggot, C.P. Morán, and P. Youngman, eds. *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington D.C. Pp. 61-93.
- Chater K. 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?. *Current Opinion in Microbiology* 4(6): 667-673. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(01\)00267-3](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(01)00267-3)

- Clancy C.J., V.L. Yu, A.J. Morris, et al. 2005. Fluconazole MIC and the fluconazole dose/MIC ratio correlate with therapeutic response among patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(8): 3171-3177. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3171-3177.2005>
- Currie C.R., J. Scott, R. Summerbell, et al. 1999a. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.
- Currie C.R., U.G. Mueller & D. Malloch. 1999b. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Ecology* 96(14): 7998-8002. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7998>
- Currie C.R., M. Poulsen, J. Mendenhall, et al. 2006. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311(5757): 81-83. <http://doi.org/10.1126/science.1119744>
- De Lima A., C. Da Silva, F. De Mesquita, et al. 2009. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie van Leeuwenhoek* 95(4): 295-303. <http://doi.org/10.1007/s10482-009-9312-0>
- De Silvestre J., S. Zea & C. Duque. 1994. Actividad antibacteriana de algunas esponjas del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 22: 21-26.
- Dhanasekaran D., S. Selvamani, A. Panneerselvam, et al. 2009. Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary, Annagkoil, Tamil Nadu. *African Journal of Biotechnology* 8(17): 4159-4162.
- Duque C. & M. Quintana. 2008. Determinación preliminar de la actividad promotora de crecimiento vegetal de actinomycetes aislados del suelo. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Drancourt M., C. Bollet, A. Carlouz, et al. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10): 3623-3630.
- El-Shahed K., A. El-Diwany & H. Awad. 2008. Enhanced production of streptomycin and hydrolytic enzymes by *Streptomyces griseous* strains using different types of organic solvents and detergent compounds. *Indian Journal of Biotechnology* 7: 341-348.

- Elliot M., M. Buttner & J. Nodwell. 2008. Multicellular development in *Streptomyces*. In: D.E. Whitworth, ed. Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation. Washington, DC: American Society of Microbiology. Pp. 419-439.
- Evangelista Z. & A. Moreno. 2007. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Biotecnología* 11(3): 37-50.
- Ezziyyani M., C. Pérez, M. Requena, et al. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.
- Faría J., M. Cagnasso, P. Izquierdo, et al. 2001. Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia* 11(6): 479-484.
- Fernández F. & S. Sendoya. 2004. Synonymic list of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biota Colombiana* 5(1): 3-105.
- Fernandez-Marin H., J.K. Zimmerman, S.A. Rehner, et al. 2006. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1594): 1689-1695. <http://doi.org/10.1098/rspb.2006.3492>
- Fernández F., V. Castro-Huertas & F. Serna. 2015. Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: *Acromyrmex* & *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Fauna de Colombia*. 1st ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Folgarait P. & G. Farji-Brener. 2005. *Un mundo de hormigas*. Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes y Siglo Veintiuno eds.
- Fowler H.G., T.M.C. Della Lucia & D.D.O. Moreira. 1993. Posição taxonômica das formigas cortadeiras. In: T.M.C. Della Lucia, ed. *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa. Pp. 262p
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Universidad de Granada.

- García-Hernández A., E. García-Vázquez, A. Hernández-Torres, et al. 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia* 24(2): 57-66.
- Gerstner A., M. Poulsen & C. Currie. 2011. Recruitment of minor workers for defense against a specialized parasite of *Atta* leaf-cutting ant fungus gardens. *Ethology Ecology y Evolution* 23(1): 61-75. <http://doi.org/10.1080/03949370.2010.529828>
- Giraldo E., J. Montoya-Lerna, J. Bentacur, et al. 2008. Microbiota asociada a la casta obrera de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) y su funcionalidad ecológica. En XXXV Congreso de la Sociedad Colombina de Entomología. Cali, Colombia.
- Girón J., & R. Pérez 2003. Tratamiento de las infecciones por *Enterococcus*. *Revista Clínica Española* 203(10): 482-485.
- Gomes R., L. Sêmedo, R. Soares, et al. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90(4): 653–661. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01294.x>
- González I., A. Ayuso-Sacido, A. Anderson, et al. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 54(3): 401-415. DOI 10.1016/j.femsec.2005.05.004.
- Gonzalez-Franco, C., & L. Robles. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Technociencia Chihuahua* 3(2): 64-73
- Goodfellow M., & S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37(1): 189-216. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
- Goodfellow M., P. Kampf, H. Busse, et al. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. In: D. Brenner, N. Krieg and J. Staley, eds. *The Proteobacteria*: Springer Science & Business Media, New York. Pp 2083
- Gordon R., & F. Lowy. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* 46(5): 350-359.

- Goriely A., & M. Tabor. 2003. Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes. *Journal of Theoretical Biology* 222(2): 211-218. [http://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00029-8](http://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00029-8)
- Haeder S., R. Wirth, H. Herz, et al. 2009. Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(12): 4742-4746.
- Harris R. & P. Hutchison. 2011. Amazonas. 1st ed. Barcelona: Bradt Travel Guides Ltd.
- Hemashenpagam N. 2011. Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes 3(3): 148–156.
- Hesketh A., H. Kock, S. Mootien, et al. 2009. The role of absC, a novel regulatory gene for secondary metabolism, in zinc-dependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 74(6): 1427-1444. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06941.x>
- Hölldobler B. & E. Wilson. 2009. *The Superorganism: The beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. 1st ed. Nueva York: W.W. Norton.
- Hölldobler B. & E. Wilson. 2010. *The Leafcutter Ants: Civilization by instinct*. Nueva York: W.W. Norton.
- Horna D. & C. Sialer. 2003. Efecto de sustancias secretadas por *Streptomyces* spp. aislados de hormigas (Tribu Attini) sobre dermatofitos. En I Congreso Internacional Científicos Peruanos, Lima, Perú. Pp. 178.
- Huang W., Z. Beharry, Z. Zhang, et al. 2003. A broad-spectrum peptide inhibitor of -lactamase identified using phage display and peptide arrays. *Protein Engineering Design and Selection* 16(11): 853-860. <http://doi.org/10.1093/protein/gzg108>
- Hwang K., H. Kim, P. Charusanti, et al. 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 32(2): 255-268. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>
- Kannowski, P. 1972. Gardening ants, the Attines. *Science* 178(4063): 856. <http://doi.org/10.1126/science.178.4063.856>

- Karthy E., P. Ranjitha & A. Mohankumar. 2009. Antimicrobial potential of plant seed extracts against Multidrug Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MDRMRSA). *International Journal of Biology* 1(1): 34-40.
- Keller L. & E. Gordon. 2010. *The lives of ants*. 1st ed. New York: Oxford University Press.
- Kieser T., M. Bibb, M. Buttner, et al. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. 2nd ed. Norwich, England: John Innes Foundation.
- Kim B., J. Kim, C.J. Chun, et al. 2004. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(2): 593-598. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02941-0>
- Kokare C., S. Kadam, R. Kakasaheb, et al. 2007. Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. *Indian Journal of Biotechnology* 6(1): 78–84.
- Koneman E. & S. Allen. 2008. *Koneman diagnóstico microbiológico*. 6th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lam K. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 9(3): 245-251. DOI 10.1016/j.mib.2006.03.004.
- Lehr N., S. Schrey, R. Hampp, et al. 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytologist* 177(4): 965-976. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x>
- Leiva S., M. Yáñez, L. Zaror, et al. 2004. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile* 132(2): 151-159. DOI 10.4067/S0034-98872004000200003.
- León J. & P. García-Tello. 1988. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Revista Peruana de Biología* 5(1): 47-64.
- León J., L. Liza, I. Soto, et al. 2007. Actinomicetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología* 14(2): 259-270. <http://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1796>

- León J., J.J. Aponte, R. Rojas, et al. 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica 28(2): 237–246.
- León J., F. Pellón, V. Unda, et al. 2014. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marino. Revista Peruana de Biología 7(2): 202-210. DOI 10.15381/rpb.v7i2.6828.
- León J., J. Aponte, D. Cuadra, et al. 2016. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. Revista de Biología Marina y Oceanografía 51(1): 69-80. DOI 10.4067/S071819572016000100007.
- Leveau J. & M. Bouix. 2000. Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza: Acribia Editorial. 595pp
- Liu C., J. Westley, T. Herman, et al. 1986. Novel polyether antibiotics X-14873A produced by *Streptomyces*: Taxonomy of the producing culture, fermentation, biological and ionophores properties of the antibiotics. Journal of Antibiotics 39(12): 1712-1718.
- Loria R., J. Kers & M. Joshi. 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. Annual Review of Phytopathology 44(1): 469-487.
- Mackay E. & W. Mackay. 1986. Las hormigas de Colombia: Arrieras del género *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). Revista Colombiana de Entomología 12: 23-30.
- Mannangatti K. & N. Mathivanan. 2011. Diversity of marine actinomycetes in the bay of Bengal and their antibacterial activity against human pathogens. Journal of the Marine Biological Association of India 53(1): 135-138.
- Manteca A. & J. Sanchez. 2010. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 1: 560-566.
- Medina H., Z. Evangelista. 2011. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. Unacar Tecnociencia 5(1): 72-78.

- Mendes T., W. Borges, A. Rodrigues, et al. 2013. Anti-candida properties of urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/83508>
- Mengana E., E. Galano, R. Pérez, et al. 2012. Uso de antimicrobianos de amplio espectro en un hospital pediátrico de Santiago de Cuba. *Medisan* 16(9): 1341-1349.
- Moncheva P., S. Tishkov, N. Dimitrova, et al. 2002. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collection* 3: 3-14.
- Moreira A., L. Forti, A. Andrade, et al. 2004. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 39(2):109-116. <http://doi.org/10.1080/01650520412331333756>
- Moser J. 2006. Complete excavation and mapping of a Texas leafcutting ant nest. *Annals of the Entomological Society of America* 99(5): 891-897. [http://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)99](http://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99)
- Murray P., E. Baron, J. Tenover, et al. 2007. *Manual de Microbiología Clínica*. 9th ed. Washington: American Society for Microbiology.
- Narayana K., P. Prabhakar, M. Vijayalakshmi, et al. 2008. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology* 57(1): 35-39.
- Narayana K. & M. Vijayalakshmi. 2009. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Brazilian Journal of Microbiology* 40(4): 725-733. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400002>
- Nuri K. & O. Yasemin. 2011. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. *Medical Mycology* 49(2): 126-131.
- Oh D.C., M. Poulsen, C. Currie, et al. 2009. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Natural Chemical Biology* 5(6): 391-393. DOI: 10.1038/nchembio.159
- Okami Y., T. Okazaki, T. Kitahara. 1976. Studies on marine microorganisms. A new antibiotic aplasmomycin produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *Journal of Antibiotics* 29(10): 1019-1025.

- Olano C., F. Lombó, C. Méndez, et al. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 10(5): 281-292. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.07.001>
- Olano C., C. Méndez & J. Salas. 2014. Antimicrobial Compounds. In: T. G. Villa and P. Veiga-Crespo, eds. *Antimicrobial compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Oskay A., T. Üsame & A. Cem. 2005. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 3(9): 441-446. <http://doi.org/10.4314/ajb.v3i9.14994>
- Pandey B., P. Ghimire & V. Agrawal. 2004. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *Journal Biology Science* 23: 44–53.
- Palaniappan S., M. Panchanathan, V. Packiyaraj et al. 2013. Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *Streptomyces* sp. CAS72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3(4): 286-293. DOI 10.1016/S2222-1808(13)60071-7
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology Advances* 22: 189-259.
- Pemán J. & E. Cantón. 2005. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: Results of a 2-year multicentre study in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases* 24(1): 23-30.
- Pfaller M. & D. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1): 133-163.
- Poulsen M., A. Bot, M. Nielsen, et al. 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52(2): 151-157. <http://doi.org/10.1007/s00265-002-0489-8>
- Pujol I., C. Aguilar, J. Gené, et al. 2000. In vitro antifungal susceptibility of *Alternaria* spp. and *Ulocladium* spp. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(2): 337.

- Prescott L., J. Harley & D. Klein. 2004. Microbiología. 7th ed. España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Ranjan R., J. Vasantba, M. Bhoomi, et al. 2015. Antibacterial potentials of actinomycetes isolated from Gujarat. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 30(1): 78-83.
- Rashad F.M., N.H.A. El-nasser, I.E. Dawoud, et al. 2015. Isolation and characterization of antibiotic/antitumor producing *Streptomyces*. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences 6(2): 1917-1929.
- Reimer L., M. Wilson & M. Weinstein. 1997. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clinical Microbiology Reviews 10(3): 444-465.
- Remya M. & V. Ramasamy. 2008. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. Medicine and Biology 15(1): 13-19.
- Rogelio J., R. Treviño, J. González, et al. 2012. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. Medicina Universitaria 14(56): 157-165.
- Rojas J., A. García & A. López. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 4(2): 28-32. DOI 0717-7917.
- Rojas P., L. Enrique, P. De León, et al. 2008. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de cuidados críticos, servicio de cuidados intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Acta Médica Peruana 25(3): 140-147.
- Roy R.N., S. Laskar & S.K. Sen. 2006. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. Microbiological Research 161(2): 121-126. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.007>
- Salazar A., C. Ordoñez, D. Hernández, et al. 2014. Actinomycetes isolated from ground of the botanical garden of Pereira Technological University. Scientia et Technica: 19(2): 223–229.

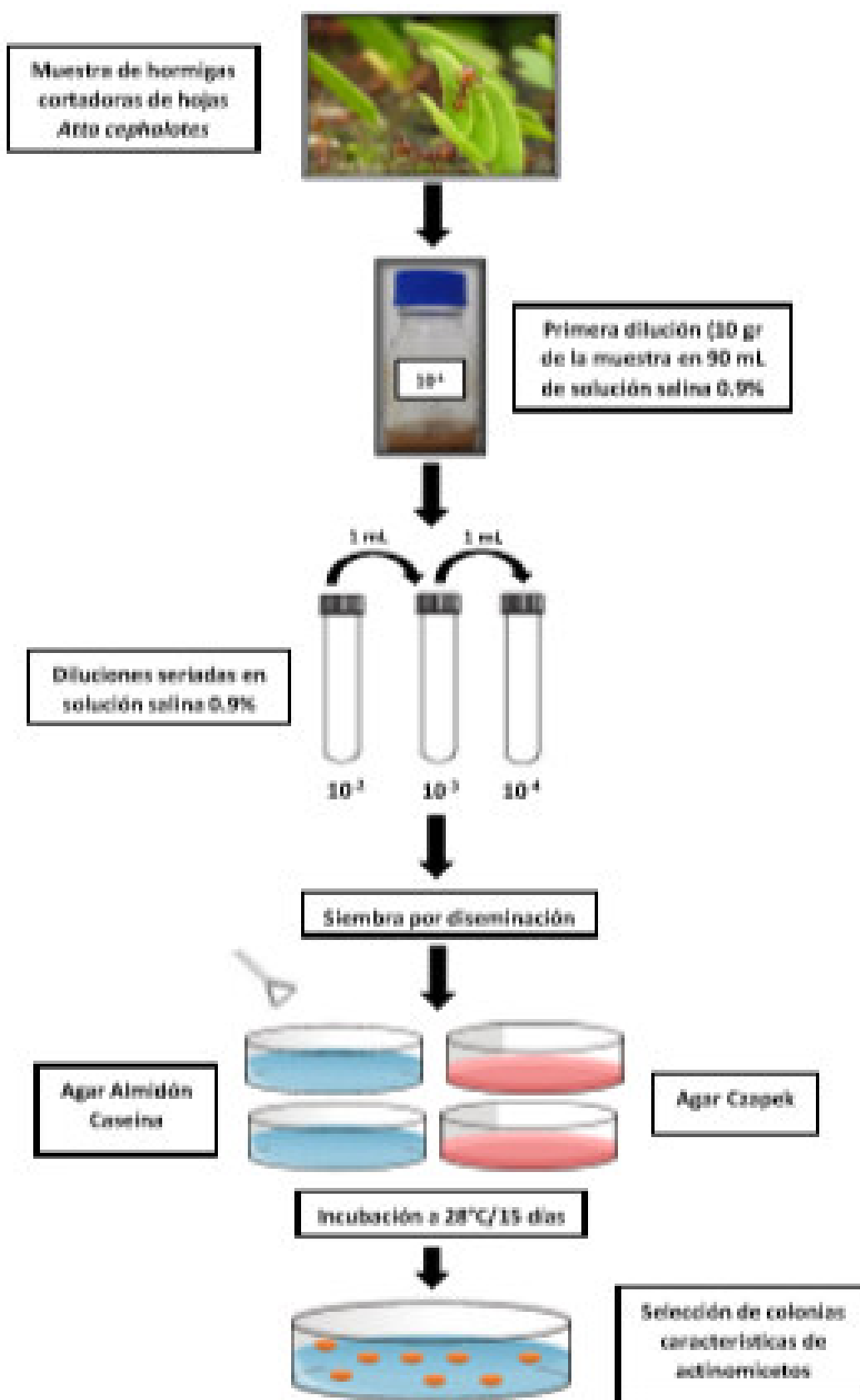
- Sánchez M., S. Sánchez, G. Gallegos, et al. 2011. Actividad Inhibitoria de actinomicetos aislados de hormigas cultivadoras de hongos (Hymenoptera: Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*. *Revista Agraria Nueva Época* 8(1): 14-17.
- Sanz A. 2005. Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá.
- Schultz T. 1999. Ants, plants and antibiotics. *Nature* 398(6730): 747-748. <http://doi.org/10.1038/19619>
- Seifert K., R. Samson & I. Chapela. 1995. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia* 87(3): 407. <http://doi.org/10.2307/3760838>
- Seipke R., J. Barke, C. Brearley, et al. 2011. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* 6(8): e22028. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022028>
- Selyanin V., G. Oborotov, G. Zenova, et al. 2005. Alkaliphilic soil actinomycetes. *Microbiology* 74(6): 729-734. <http://doi.org/10.1007/s11021-005-0131-7>
- Serna F. & J. Correa. 2003. Extractos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* como fagoinhibidores de *Atta cephalotes* leaf-cutter ants. *Agronomía Colombiana* 21(3): 142-153.
- Shirling E. & D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313-340.
- Sialer C., D.H. Horna, C. Méndez, et al. 2008. Caracterización de compuestos biocidas asociados a hormigas de la tribu Attini. En *Memorias del II Congreso Binacional de Investigación, Ciencia y Tecnología de las Universidades Lima, Perú*. Pp. 50-853
- Taerum S., M. Cafaro, A. Little, et al. 2007. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274(1621): 1971-1978. <http://doi.org/10.1098/rspb.2007.0431>

- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, et al. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tanaka Y., K. Kasahara, Y. Hirose, et al. 2013. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 195(13): 2959-2970. <http://doi.org/10.1128/JB.00147-13>
- Tibazco D., J. Rodríguez, E. Silva, et al. 2007. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Biomédica* 27: 294-307.
- Trofa D., A. Gácsér & J. Nosanchuk. 2008. *Candida parapsilosis* an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 606-625.
- Ventura M., C. Canchaya, A. Tauch, et al. 2007. Genomics of actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3): 495-548. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Vittar F. 2008. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de la mesopotamia Argentina. *INSUGEO. Miscelánea* 17(2): 447-466.
- Vo T., U. Mueller & A. Mikheyev. 2009. Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). *Mycologia* 101(2): 206-210. <http://doi.org/10.3852/07-055>
- Waksman S. & H. Woodruff. 1941. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 42(2): 231-249.
- Walker T. & M. Aguilar. 2000. *Microbiología*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Walsh C. 2003. Where will new antibiotics come from?. *Nature Reviews Microbiology* 1(1): 65-70.
- Vijayakumar R., S. Murugesan & A. Panneerselvam. 2010. Isolation, characterization and antimicrobial activity of actinobacteria from point Climere Coastal Region, East Coast of India. *International Research Journal of Pharmacy* 1(1): 358-365.

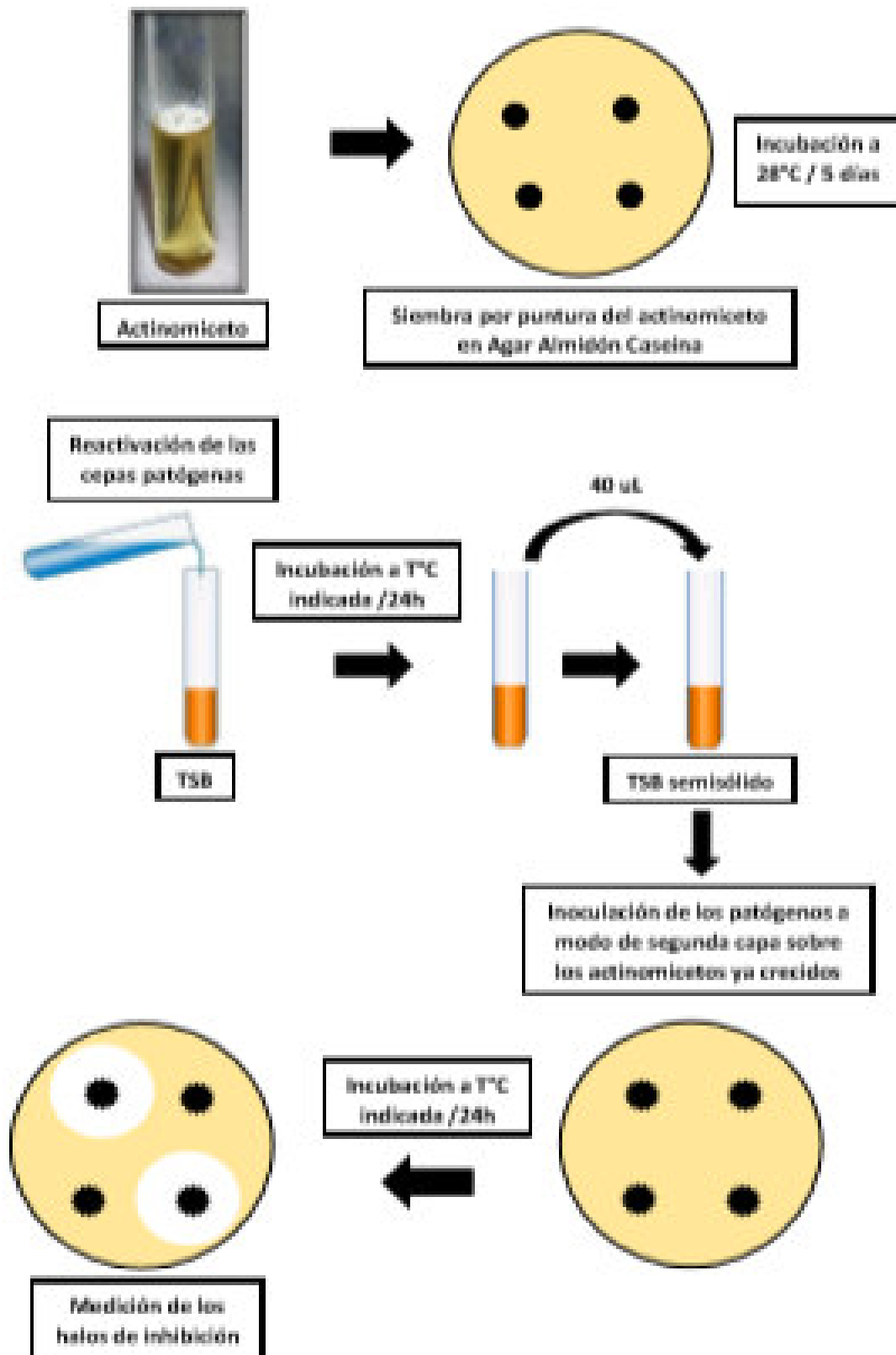
- World Health Organization 2001. (en línea). Global strategy for containment of antimicrobial resistance. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acceso 25/12/2015.
- Yek S., J. Boomsma & M. Schiøtt. 2013. Differential gene expression in *Acromyrmex* leaf-cutting ants after challenges with two fungal pathogens. *Molecular Ecology* 22(8): 2173-2187. <http://doi.org/10.1111/mec.12255>
- Yepes A. 2010. Estudio de sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Zakalyukina Y., G. Zenova & D. Zviyagintsev. 2002. Acidophilic soil actinomycetes. *Microbiology* 71(3): 342-345.
- Zhou H., Y. Yang, T. Peng, et al. 2014. Metabolites of *Streptomyces* sp., an endophytic actinomycete from *Alpinia oxyphylla*. *Natural Product Research* 28: 265-267
- Zucchi T.D., A.S. Guidolin & F.L. Cônsoli. 2011. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiological Research* 166(1): 68-76. DOI 10.1016/j.micres.2010.01.009.

11. ANEXOS

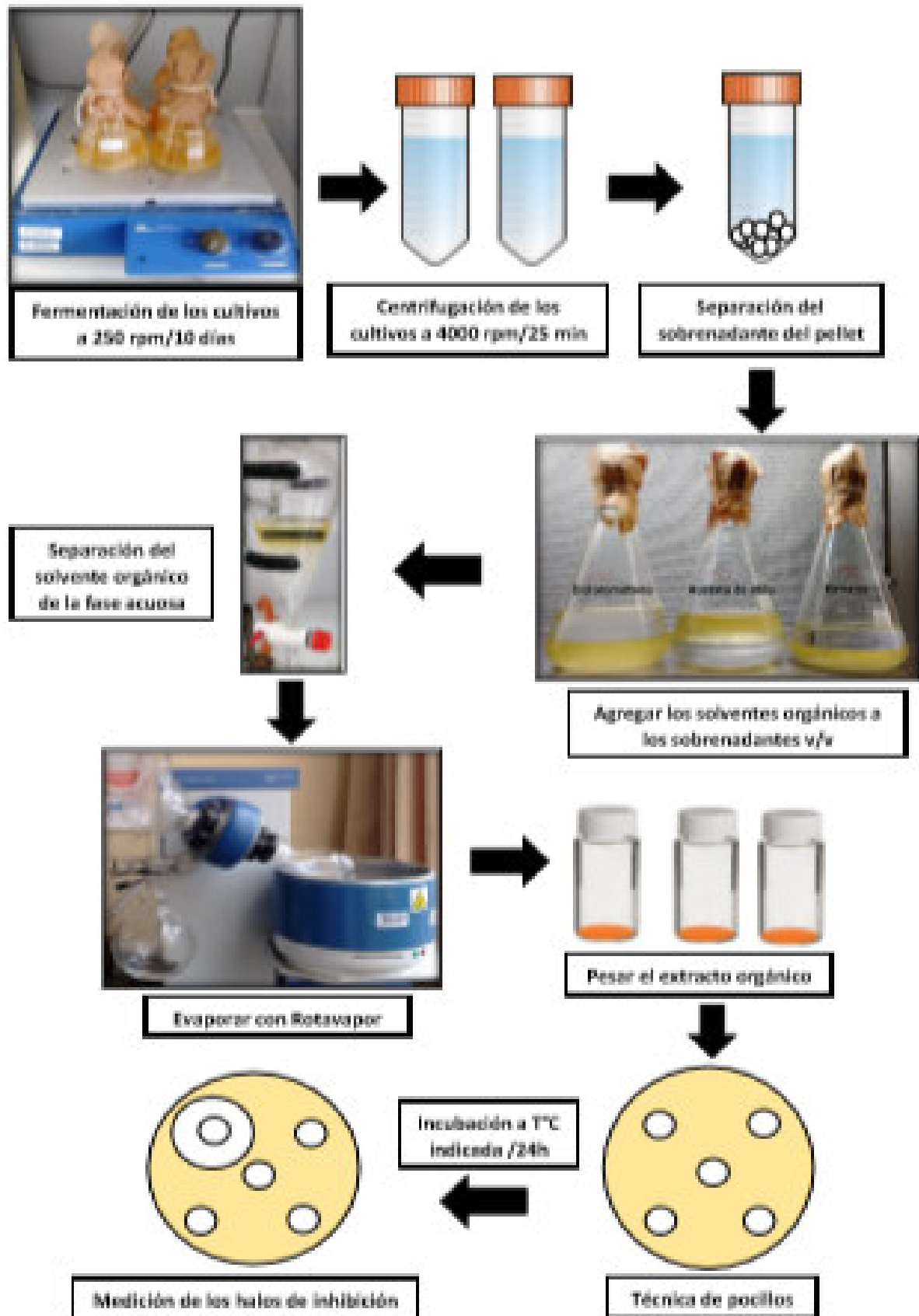
1. Aislamiento y selección de actinomicetos asociados a *Atta cephalotes*



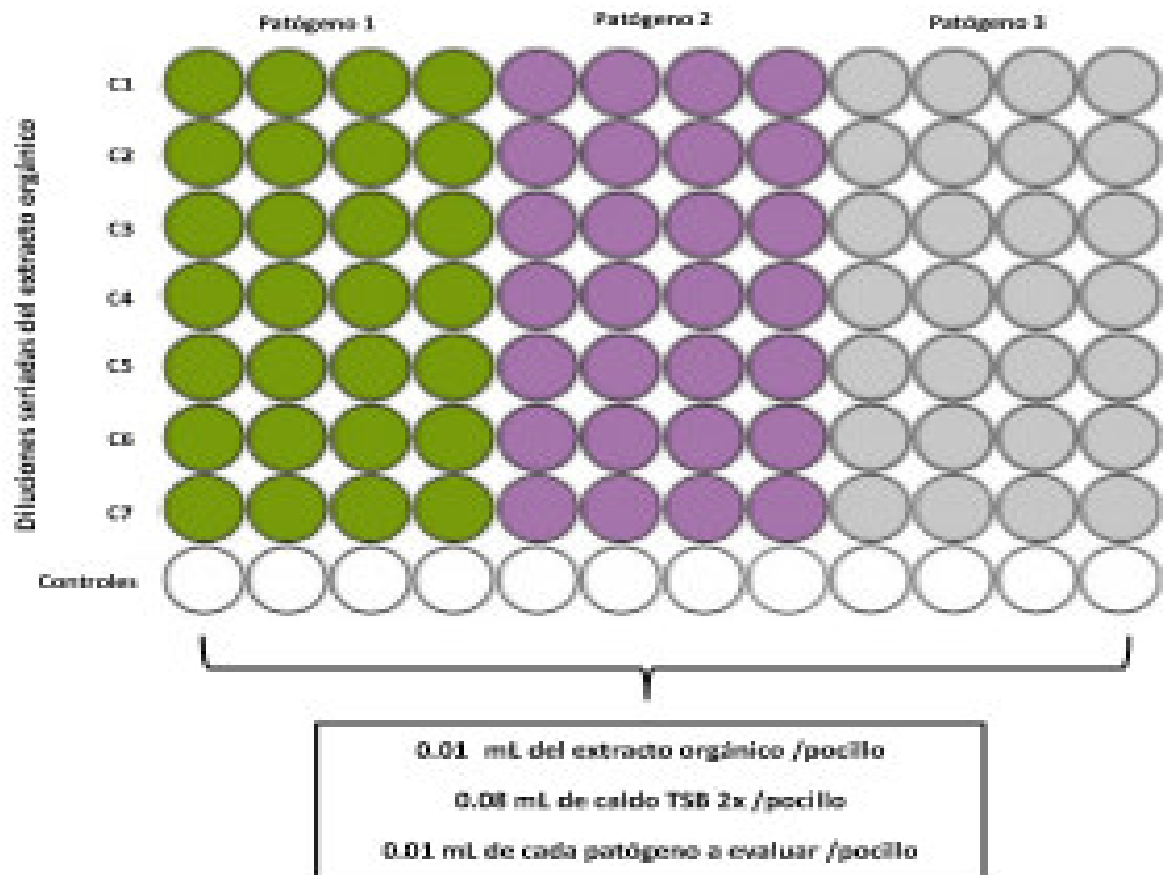
2. Pruebas de antagonismo en placas de actinomicetos frente a patógenos de importancia clínica



3. Obtención del extracto orgánico antimicrobiano y determinación de la capacidad antagonista



4. Diagrama para la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)



Medios de cultivo

▪ Agar Almidón Caseína (AAC)	g/L
Almidón	10,0
Caseína	1,0
Nitrato de Potasio	2,0
Cloruro de Sodio	2,0
Di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sulfato de Magnesio	0,05
Carbonato de Calcio	0,02
Sulfato ferroso	0,01
Agar Bacteriológico	15,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,0
▪ Agar Czapeck (ACZ)	g/L
Sacarosa	30,0
Nitrato de Sodio	3,0
Sulfato de Magnesio	0,5
Cloruro de Potasio	0,5
Sulfato de Hierro (II)	0,01
Di-Potasio Hidrógeno Fosfato	1,0
Agar Bacteriológico	13,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,2
▪ Caldo Extracto de Levadura – Glucosa	g/L
Extracto de levadura	1,0
Peptona de soya	4,0
Glucosa	5,0 **
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,0

** :Opcional

▪ Agar Extracto de Levadura – Extracto de Malta (ISP 2)	g/L
Extracto de levadura	4,0
Extracto de malta	10,0
Glucosa	4,0
Agar Bacteriológico	20,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,3
▪ Agar Avena (ISP 3)	
Avena*	18,0
Agar	15,0
Solución Trasa	1,0 mL
Agua destilada	1000,0 mL
*Hervir el agua con la avena por 15 min	
▪ Agar sales inorgánicas – almidón (ISP 4)	
Almidón	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
NaCl	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
CaCO ₃	2,0
Solución Trasa	1,0 mL
Agua destilada	1000,0 mL
Agar	15,0
▪ Agar glicerol asparragina (ISP 5)	
Glicerol	10,0
L-asparagina	4,0
K ₂ HPO ₄	4,0
Solución Trasa	1,0 mL
Agua destilada	1000,0 mL
Agar	15,0

▪ Soluciones traza	g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
Agua destilada	1000,0 mL
▪ Agar Tripticasa Soya (TSA)	g/L
Tripteína	15,0
Peptona de soya	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar bacteriológico	15,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,3
▪ Caldo Tripticasa Soya (TSB)	g/L
Tripteína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,3
▪ Caldo Sabouraud Dextrosa	g/L
Digerido enzimático de caseína	10,0
Dextrosa	20,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	5,6

▪ Agar Sabouraud Dextrosa	g/L
Digerido enzimático de caseína	10,0
Dextrosa	20,0
Agar Bacteriológico	15,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	5,6
▪ Agar Mueller Hinton	g/L
Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar bacteriológico	15,0
Agua destilada	1000,0 mL
pH	7,3