



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EXTRACCIÓN DE MOLÉCULAS
BIOACTIVAS DE HONGOS
PREVIAMENTE AISLADOS DEL
TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE
HERMETIA ILLUCENS CONTRA
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR
PULLORUM ATCC® 13036™”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MARIO RICARDO RUIZ BURGA

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Denis Helan Castillo Pareja, PhD.

JURADO DE TESIS

DRA. KATHERINE JESSICA TORRES FAJARDO

PRESIDENTE

MG. LEON FAUSTINO VILLEGAS VILCHEZ

VOCAL

DRA. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mi mamá Angela, por su apoyo inquebrantable y por ser mi mayor ejemplo de resiliencia y dedicación. Gracias por siempre estar ahí, brindándome tu sabiduría y amor en cada paso de este camino.

A mi novia Pilar, por su constante apoyo, comprensión y amor. Gracias por ser mi compañera en este viaje y por creer en mí en todo momento.

A ambas, dedico esta tesis con todo mi cariño y gratitud. Sin ustedes, esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Denis Castillo, por su guía y apoyo constante. Sus valiosos consejos y orientación han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Gracias por creer en mi capacidad y por impulsar mi crecimiento académico y personal.

Al jefe del laboratorio de Química de la Vida-IRD, el Dr. Michel Sauvain, por proporcionarme las herramientas y el entorno necesario para llevar a cabo mi investigación. Su liderazgo y disposición para ayudar siempre fueron una gran motivación.

Al Dr. Billy Cabanillas, por su inestimable ayuda y colaboración a lo largo de este proyecto. Su entusiasmo y disposición para resolver cualquier duda fueron clave para superar muchos desafíos.

Al Dr. Mohamed Haddad, por su invaluable ayuda y acogida durante mi pasantía en Francia, en el Laboratorio PHARMADEV-IRD. Su guía y conocimiento fueron esenciales para el éxito de mi estancia y mi aprendizaje.

A mis compañeros del laboratorio PARMMADEV-IRD: Adrien Vitrai, Clara Litot y Emie Groppi, por su colaboración y compañerismo. Gracias por hacer de esa experiencia algo inolvidable y por su apoyo durante nuestra estancia.

A mis amigos del laboratorio de Química de la Vida: Estrellita, Deyanira, Mishell, Odette, Marco, Rosa, Lorena, Mariel, Karla, Raúl, Lucero, y demás pasantes, por compartir este viaje conmigo. Su camaradería y apoyo hicieron de este camino una experiencia mucho más enriquecedora y llevadera. En especial, a Álvaro, por su constante apoyo y amistad. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar, por tus consejos y por hacer de cada día en el laboratorio una experiencia memorable.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco del concurso E074 - 2022-01 “Tesis y Pasantías en Ciencia, Tecnología e Innovación”

[PE501081912-2022-PROCIENCIA]



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EXTRACCIÓN DE MOLÉCULAS
BIOACTIVAS DE HONGOS
PREVIAMENTE AISLADOS DEL
TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE
HERMETIA ILLUCENS CONTRA
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR
PULLORUM ATCC® 13036™”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MARIO RICARDO RUIZ BURGA



Informe estándar

Informe en inglés no disponible Más información

11% Similitud estándar

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas

1 Internet

repositorio.upch.edu.pe

21 bloques de texto 274 palabra que coinciden

2 Internet

brill.com

4 bloques de texto 165 palabra que coinciden

3 Internet

repositorioinstitucional.uabc.mx

3 bloques de texto 96 palabra que coinciden

4 Internet

1library.co

4 bloques de texto 92 palabra que coinciden

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Antecedentes	2
1.2.	Planteamiento del problema	7
1.3.	Justificación del estudio	9
II.	OBJETIVOS	11
2.1.	Objetivo principal.....	11
2.2.	Objetivos específicos	11
III.	MARCO TEÓRICO.....	12
3.1.	Generalidades de <i>Hermetia illucens</i>	12
3.1.1.	Distribución.....	12
3.1.2.	Breve descripción morfológica	12
3.1.3.	Ciclo de vida	12
3.1.4.	Importancia económica - ambiental	13
3.2.	Generalidades de los hongos.....	14
3.2.1.	Morfología	14
3.2.2.	Fisiología.....	14
3.2.3.	Reproducción	15

3.2.4.	Breve Taxonomía	15
3.2.5.	Filo Ascomycota	15
3.2.6.	Filo Basidiomycota	18
3.2.7.	Simbiosis con insectos	19
3.2.8.	Micobiota en insectos.....	19
3.2.9.	Micobiota de <i>Hermetia illucens</i>	19
3.3.	Metabolitos secundarios de hongos	20
3.4.	Métodos de evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana.....	22
3.4.1.	Difusión en disco en agar.....	22
3.4.2.	Difusión en pozos de agar	22
3.4.3.	Agar plug.....	23
3.4.4.	Bioautografía - Cromatografía en capa fina (TLC).....	24
3.4.5.	Microdilución en caldo	27
IV.	METODOLOGÍA	29
4.1.	Material biológico	29
4.2.	Criopreservación de <i>S. enterica</i> serovar Pullorum y reactivación de las cepas fúngicas previamente aisladas	30
4.3.	Pruebas de antagonismo	31
4.3.1.	Pruebas de antagonismo en cepas fúngicas levaduriformes	31
4.3.2.	Pruebas de antagonismo en cepas fúngicas filamentosos	32

4.4.	Preparación de cultivo fúngico en medio líquido	33
4.5.	Extracción líquido – líquido a partir de cultivo fúngico	33
4.6.	Extracción alcohólica.....	34
4.7.	Evaluación de la actividad antibacteriana	34
4.7.1.	Bioautografía por superposición de agar.....	35
4.7.2.	Microdilución en caldo	36
4.8.	Identificación de la cepa HGU11_3	36
4.9.	Fraccionamiento mediante MPLC	37
4.9.1.	Subfraccionamiento mediante MPLC	39
4.10.	Análisis UHPLC/MS.....	40
4.10.1.	Parámetros de UHPLC	40
4.10.2.	Parámetros de HR-ESI-MS	40
4.10.3.	Procesamiento de la data	41
4.11.	Análisis estadístico.....	41
V.	RESULTADOS	42
5.1.	Pruebas de antagonismo entre los hongos y <i>Salmonella enterica</i> serovar Pullorum ATCC 13036.....	42
5.2.	Identificación de la cepa HGU11_3	42
5.3.	Cultivo en masa del hongo <i>A. chevalieri</i>	44

5.4.	Extracción de metabolitos secundarios a partir de cultivo líquido de <i>A. chevalieri</i>	45
5.5.	Pruebas biológicas de los extractos crudos de <i>A. chevalieri</i>	46
5.5.1.	Bioautografía por punto de los extractos crudos.....	46
5.5.2.	Microdilución en caldo de los extractos crudos.....	47
5.6.	Fraccionamiento del extracto crudo de acetato de etilo (EtOAc)	48
5.7.	Bioautografía por punto de las fracciones del extracto crudo de acetato de etilo de <i>A. chevalieri</i>	49
5.8.	Sub-fraccionamiento de las fracciones activas del extracto crudo de acetato de etilo de <i>A. chevalieri</i> . mediante el sistema puriFlash 520 xs Plus.....	51
5.9.	Bioautografía por punto de las sub-fracciones del extracto crudo de acetato de etilo de <i>A. chevalieri</i>	53
5.10.	Análisis UHPLC/MS.....	54
VI.	DISCUSIÓN	59
VII.	CONCLUSIONES	75
VIII.	RECOMENDACIONES	76
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
X.	ANEXOS.....	99

RESUMEN

La comunidad fúngica del tracto digestivo de las larvas de *Hermetia illucens* representa una fuente de compuestos biológicamente activos con propiedades promisorias antibióticas, ofreciendo alternativas prometedoras a los antibióticos convencionales. *Salmonella enterica* serovar Pullorum, responsable de la tifoidea aviar, provoca pérdidas económicas en la industria avícola, y los tratamientos con antibióticos contribuyen a la resistencia bacteriana. La aplicación específica contra este patógeno sigue sin ser explorada.

El estudio tiene como objetivo llenar vacíos de conocimiento al destacar el potencial de los hongos asociados con *H. illucens* como fuente de moléculas antibióticas efectivas contra *S. enterica* serovar Pullorum.

La exploración de la actividad sobre *S. enterica* serovar Pullorum de los hongos aislados del intestino de las larvas de la mosca soldado-negra (BSF) permitió la identificación de un hongo activo. El hongo fue identificado como *Aspergillus chevalieri* y codificado como HGU11_3. El siguiente paso fue el cultivo líquido a gran escala. Posteriormente, se obtuvo un extracto de acetato de etilo, y su actividad antimicrobiana fue validada a través de bioautografía y microdilución en caldo. Se realizó un fraccionamiento bio-dirigido utilizando cromatografía MPLC. Las fracciones activas fueron analizadas mediante UHPLC/MS. El análisis por espectrometría de masas reveló que las fracciones bioactivas de *A. chevalieri* estaban compuestas por diketopiperazinas, derivados peptídicos, isocoumarinas,

derivados de benzofurano, flavinas, terpenoides y ftalatos. En conclusión, estos hallazgos sugieren un potencial interés terapéutico en las subfracciones bioactivas identificadas, allanando el camino para futuras investigaciones en sus aplicaciones biomédicas y veterinarias.

PALABRAS CLAVE: COMUNIDADES FÚNGICAS, *H. illucens*, *A. chevalieri*, *S. enterica* serovar Pullorum, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

ABSTRACT

The fungal community of *Hermetia illucens* larvae's digestive tract, represents a source of biologically active compounds with potential antibiotic properties, offering promising alternatives to conventional antibiotics. *Salmonella enterica* serovar Pullorum, responsible for avian typhoid, results in economic losses in the poultry industry, and antibiotic treatments contribute to bacterial resistance. Specific application against this pathogen remains unexplored.

The study aims to fill knowledge gaps by highlighting the potential of *H. illucens* associated fungi as a source of effective antibiotic molecules against *S. enterica* serovar Pullorum.

The exploration of the activity on *S. enterica* serovar Pullorum of fungi isolated from Black Soldier Fly (BSF) larvae's gut allowed the identification of an active fungus. The fungus was identified as *Aspergillus chevalieri* and coded as HGU11_3. The following step was mass liquid cultivation. Subsequently, an ethyl acetate extract was obtained, and its antimicrobial activity was validated through bioautography and broth microdilution. Bio-guided fractionation was carried out using MPLC chromatography. The active fractions were analyzed by UHPLC/MS. Mass spectrometry analysis revealed that the bioactive fractions from *A. chevalieri* were composed of diketopiperazines, peptide derivatives, isocoumarins, benzofuran derivatives, flavins, terpenoids, and phthalates. In conclusion, these

findings suggest a potential therapeutic interest in the identified bioactive subfractions, paving the way for future investigations into their biomedical and veterinary applications.

KEYWORDS: FUNGAL COMMUNITIES, *H. illucens*, *A.chevalieri*, *S.enterica* serovar Pullorum, ANTIMICROBIAL ACTIVITY.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana constituye uno de los desafíos más apremiantes para la salud pública mundial, disminuyendo la eficacia de los tratamientos convencionales y aumentando la urgencia de encontrar nuevas soluciones (Haque et al., 2020). En este contexto, la micobiota (comunidades de hongos) del tracto digestivo de *Hermetia illucens*, también conocida como la mosca soldado negra, surge como una fuente prometedora de compuestos biológicamente activos, con potenciales propiedades antibióticas (Baranova et al., 2021; Correa et al., 2019). La investigación previa ha señalado la capacidad de estos hongos para sintetizar compuestos bioactivos, lo que plantea la posibilidad de encontrar alternativas a los antibióticos convencionales (J. L. Li et al., 2019; Nord et al., 2019; Sun et al., 2020).

Las larvas de *Hermetia illucens*, además de ser detritívoras y destacar por su capacidad de biotransformar residuos orgánico, alberga en su intestino una diversidad de microorganismos con potencial biotecnológico poco explorado (Mudalungu et al., 2021). La identificación de estos compuestos hasta la fecha, si bien es prometedora, no ha abordado su aplicación contra patógenos específicos y prevalentes como *Salmonella enterica* serovar Pullorum, una bacteria que representa un riesgo significativo en la producción avícola al causar pullorosis, una enfermedad altamente perjudicial (Ding et al., 2021; Z. Gao et al., 2019).

Actualmente, uno de los mayores desafíos para la salud pública es la resistencia antimicrobiana, que disminuye el éxito de los tratamientos basados en antibióticos (Liu et al., 2020; Yang et al., 2019). En este contexto, la búsqueda de

nuevas fuentes de agentes antimicrobianos ha llevado a la exploración de microorganismos presentes en diversas especies, destacando la importancia de investigar en entornos no convencionales, como los hongos del tracto digestivo de organismos como *Hermetia illucens*, aprovechando los compuestos provenientes de fuentes naturales (Baranova et al., 2021; Bruno et al., 2019; Correa et al., 2019; Terova et al., 2019)

En este contexto, el presente estudio se justifica como una contribución importante para abordar la brecha de conocimiento existente, proporcionando información valiosa sobre el potencial de los hongos aislados de *H. illucens* como fuente de moléculas antibióticas efectivas contra *S. enterica* serovar Pullorum.

Los objetivos de este trabajo comprenden la extracción y caracterización de moléculas antibióticas a partir de los hongos del tracto digestivo de *Hermetia illucens*, así como la evaluación de su actividad específica contra *S. enterica* serovar Pullorum. A través de esta investigación, buscamos proporcionar alternativas viables y sostenibles para la industria avícola, marcando un paso importante hacia la mitigación de la crisis de resistencia antimicrobiana.

1.1. Antecedentes

La búsqueda e identificación de metabolitos secundarios de hongos ha sido un campo de estudio central en la industria farmacéutica y biotecnológica, con posibles aplicaciones terapéuticas tanto en la medicina veterinaria como humana (Sharifi-Rad et al., 2021). Los estudios descritos a continuación han explorado la identificación y caracterización de metabolitos secundarios fúngicos, así como el

desarrollo y estandarización de metodologías para su extracción y evaluación de sus propiedades antibacterianas.

En el trabajo de Chovanová y Zamocky (2016), se investigaron las propiedades antibacterianas del hongo *Chaetomium cochliodes*. El objetivo de este estudio fue explorar el potencial antibacteriano de las moléculas del hongo *C. cochliodes*. Mediante el uso de la técnica de enfrentamiento en bloque de agar, se emplearon cepas de *C. cochliodes* y *C. globosum* de su propia colección, las cuales fueron añadidas en discos de agar sobre la superficie de una placa con agar previamente sembrado con *S. aureus*. Luego de ser incubadas a diferentes temperaturas, se observaron halos de inhibición rodeando el bloque de agar con el hongo, indicando la presencia de compuestos bioactivos contra *S. aureus*. Como conclusión, se demostró que los hongos filamentosos son potenciales fuentes de diversas moléculas antimicrobianas, lo que confirma que la familia Chaetomiaceae es candidata apropiada para el tamizaje de sustancias antibacterianas con posibles aplicaciones futuras en la biotecnología agrícola y en la medicina (Chovanová & Zámocký, 2016).

En otro estudio, llevado a cabo por de Li et al (2019) en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Nantong, China, se identificaron nuevas moléculas derivadas de microorganismos marinos procedentes del Mar de China Oriental. Esta investigación tuvo como propósito identificar y caracterizar nuevas moléculas bioactivas provenientes de organismos marinos. Lograron aislar de una almeja marina sin identificar, el hongo *Aspergillus versicolor*, el cual fue cultivado en medio líquido, y el caldo filtrado se sometió a extracción con acetato de etilo, posterior fraccionamiento mediante cromatografía líquida en columna de sílica gel,

y posteriormente, las fracciones se purificaron mediante HPLC semipreparativa. Después, las fracciones fueron evaluadas contra *S. aureus* mediante difusión radial en agar. Como hallazgos principales, se logró identificar 2 compuestos derivados de antraquinonas, 6,6'-oxybis(1,3,8-trihydroxy-2-((S)-1-methoxyhexyl)anthracene-9,10-dione) y 6,6'-oxybis(1,3,8-trihydroxy-2-((S)-1-hydroxyhexyl)anthracene-9,10-dione). Ambos compuestos mostraron una actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, resultado que los llevó a la conclusión de que las antraquinonas presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas (J. L. Li et al., 2019).

Además, en el trabajo realizado por Nord et al. (2019) en el Departamento de Ciencias Moleculares, Uppsala BioCentrum, de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas en Suecia, tuvo como propósito de estudio encontrar candidatos a nuevos antibióticos del hongo *Penicillium spathulatum* aislado de guano de murciélago. Para ello, prepararon un cultivo líquido de *P. spathulatum* en caldo extracto de malta/papa y añadieron una resina polimérica (Amberlite XAD 16) para absorber los metabolitos. Luego, extrajeron los compuestos de la resina y posteriormente fueron purificados por HPLC preparativa de fase reversa, y evaluaron su actividad antibacterial. Finalmente, los compuestos activos se analizaron UHPLC/MS y se identificaron mediante resonancia magnética nuclear (NMR). Como resultado, descubrieron que el hongo *Penicillium spathulatum* produjo dos compuestos con actividad contra bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas: La Spatulina A y B, con lo que concluyeron que ambos compuestos presentan interesantes espectros de actividad antibacteriana (Nord et al., 2019).

Todos los aportes de Nord (2019) se relacionan también con el trabajo de Mosquera et al. (2020), ejecutado en la Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia, con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de hongos endófitos de *Mammea americana* y *Moringa oleifera* contra *S. aureus* y *E. coli* sensibles y resistentes antibióticos como la meticilina. Para ello, se aislaron los hongos endófitos a partir de las plantas medicinales anteriormente mencionadas y realizaron un tamizaje de cepas fúngicas mediante cocultivo para determinar que especies de hongos presentaban una mayor actividad antibacteriana. Posteriormente, se llevó a cabo el cultivo en biomasa y la extracción etanólica de los hongos seleccionados para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC) de los extractos crudos. Los resultados mostraron que hongos *Penicillium sp* y *Cladosporium sp.* y sus respectivos extractos etanólicos presentaron una mayor inhibición en cepas sensibles y resistentes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estos resultados destacan la presencia de metabolitos secundarios bioactivos con propiedades antibacterianas en hongos endofíticos de *M. oleifera* y *M. americana*. Sin embargo, recomendaban realizar trabajos posteriores de identificación química de los compuestos y el estudio de sus mecanismos de acción (Mosquera et al., 2020).

Estos antecedentes destacan la importancia de los hongos como fuente potencial de compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas. Específicamente, el estudio de metabolitos secundarios de hongos asociados a *Hermetia illucens* ha estado surgiendo como como un nicho prometedor en el mismo ámbito biotecnológico y farmacéutico (Baranova et al., 2021; Correa et al., 2019). A pesar

de su potencial, es importante destacar que existen pocos estudios enfocados en este tema específico. Por otro lado, las investigaciones realizadas hasta la fecha han arrojado resultados alentadores, como en el trabajo de Correa et al (2019), desarrollado en el Laboratorio Mixto Internacional de Química de la Vida de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, Perú, cuyo objetivo fue aislar e identificar hongos con actividad antimicrobiana a partir del intestino de larvas de *H. illucens*, así como aislar e identificar compuestos antimicrobianos a partir del cultivo líquido de los hongos aislados. Luego de un tamizaje previo de todos los hongos aislados, se encontró que el hongo *Chrysosporium multifidum* del tracto digestivo de *Hermetia illucens* presentó mayor actividad contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 13311. Luego de esto, se cultivó el hongo en medio líquido y realizaron la extracción del caldo acetato de etilo. Posteriormente, se procedió a la separación del extracto crudo de acetato de etilo en fracciones, las cuales fueron evaluadas para determinar su actividad antibacteriana (bioautografía, MIC e IC₅₀). Finalmente, analizaron las fracciones más activas mediante UHPLC/MS, y para los compuestos que no se hallaron coincidencias en las librerías se analizaron mediante NMR. Como resultados, se identificó por resonancia magnética nuclear como α -pirona, el cual fue el compuesto más activo contra *S. aureus*. Estos primeros resultados de la exploración de la microbiota de *H. illucens* indican que puede ser una fuente útil de compuestos antibacterianos con actividad contra otros patógenos resistentes a los fármacos. Además, esto abre una ventana para explicar cómo las larvas de *H. illucens* controlan la ingestión de microorganismos patógenos en alimentos contaminados por hongos endosimbióticos (Correa et al., 2019).

En la misma línea de investigación, en el estudio de Baranova et al (2021), en el Gause Institute of New Antibiotics de Moscú, Rusia, aislaron hongos de *H. illucens* y se evaluó su actividad antagonista mediante cocultivo contra hongos entomopatógenos y bacterias. Descubrieron que el hongo *Byssoschlamys nivea* presentaba actividad contra diversos hongos que afectan a la mosca soldado-negra, como *Beauveria bassiana*(Lecocq et al., 2021) y *Escherichia coli* ATCC 25922. Después, realizaron el cultivo líquido *B. nivea*, para obtener los compuestos activos mediante la extracción con acetato de etilo y purificar el extracto crudo utilizando diferentes técnicas cromatográficas(Baranova et al., 2021). Aunque estos resultados son prometedores, se precisa más investigación con énfasis en la detección de moléculas mediante técnicas como la espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear (NMR). La profundización en estos temas es fundamental para comprender más a detalle sobre el potencial terapéutico de los compuestos aislados y su eventual aplicación en la medicina veterinaria o humana

1.2. Planteamiento del problema

El descubrimiento de las propiedades promotoras del crecimiento de subdosis de antibióticos ha promovido su inclusión como suplementos en la dieta de animales de granja. Aunque esta práctica aumenta la productividad cárnica, el uso continuo e incorrecto de los antibióticos como aditivos alimentarios ha llevado al surgimiento de cepas bacterianas avícolas resistentes a los antibióticos como *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli*. (Ding et al., 2021; P. Huang et al., 2018; Suresh et al., 2018).

Además, la aplicación de antibióticos en la dieta de los animales resulta en la aparición de genes de resistencia y residuos no digeridos de estos compuestos.

Estos residuos se consideran como elementos contaminantes emergentes en el medio ambiente, cuyo impacto recae en los cuerpos de agua y el suelo, que son reservorios clave de resistencia a los antibióticos. Como se ha mencionado anteriormente, los antibióticos que no se metabolizan por completo por las aves de corral, son excretados, lo que propicia la introducción de los antibióticos, bacterias resistentes y genes de resistencia al suministro de agua potable y a los suelos agrícolas. En el caso de que los contaminantes lleguen al suelo, pueden filtrarse hacia aguas subterráneas o pozos de regadíos a través de la escorrentía de las aguas residuales del ganado, y afectar la composición de las comunidades microbianas. El ser humano puede adquirir residuos de antibióticos, bacterias resistentes e incluso genes de resistencia al consumir vegetales regados con el agua contaminada. En el medio acuático, los antibióticos se degradarán (total o parcialmente) o se acumularán en los tejidos de los organismos acuáticos, que luego pueden ser consumidos por los seres humanos (Cai et al., 2018; Suresh et al., 2018).

Un microorganismo patógeno vinculado a la resistencia de antibióticos es *Salmonella entérica* serovar Pullorum, una bacteria causante de la pullorosis una enfermedad sistémica aguda septicémica. Los signos clínicos de esta enfermedad incluyen la diarrea blanca, anorexia, deshidratación, depresión, somnolencia, debilidad, artritis, gastroenteritis, inapetencia y afectación de la postura de huevos (Ding et al., 2021; Guo et al., 2019; Lu et al., 2020; Shuai-Cheng et al., 2019; Xu et al., 2016). Los polluelos son los más vulnerables, cuya mortalidad puede ser total a los 20 días. Por otro lado, en pollos adultos, la enfermedad puede ser asintomática, sin embargo, son portadores de la enfermedad de por vida, facilitando la transmisión vertical y horizontal de la bacteria a su descendencia, complicando su erradicación.

En la actualidad, no se cuentan con medidas de control eficaces contra la pullorosis, excepto la erradicación de origen. Sin embargo, aunque los antibióticos solían ser eficaces para prevenir las infecciones de *S. enterica* serovar Pullorum, la propagación de cepas multirresistentes ha reducido su eficacia. El impacto económico de la pullorosis puede ser muy elevado porque, además de la mortalidad de las aves, existen elevados costes veterinarios, disposición de aves muertas, saneamiento y limpieza de instalaciones potencialmente infectadas, etc.(Ding et al., 2021; Shuai-Cheng et al., 2019). En consecuencia, debido a la alta tasa de mortalidad y a la difícil erradicación, la pullorosis representa importantes pérdidas económicas en la industria avícola, especialmente para los países en vías de desarrollo (Ding et al., 2021; Guo et al., 2019; Lu et al., 2020; Shuai-Cheng et al., 2019; Xu et al., 2016). En adición, la resistencia a los antibióticos por parte de esta especie hace que se necesiten estrategias terapéuticas alternativas (Hussein et al., 2019).

Ante esta problemática se planteó el aislamiento e identificación de moléculas bioactivas de la comunidad fúngica del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* como posibles productores de compuestos naturales con actividad antibacteriana contra *Salmonella enterica* serovar Pullorum.

1.3. Justificación del estudio

Las larvas de *Hermetia illucens* son capaces de biotransformar desechos orgánicos (Diener et al., 2009; Myers et al., 2008) gracias a la microbiota de su tracto digestivo, la cual le otorga a la larva una barrera de defensa contra la colonización de patógenos (Seong et al., 2008; H. Yu et al., 2008). En la literatura científica se encuentran diversos estudios que solo han identificado comunidades

bacterianas en el tracto digestivo de las larvas, no obstante, se reportan pocos estudios acerca de la microbiota (comunidad fúngica) intestinal, la cual también sintetiza una variedad de metabolitos secundarios contra agentes patógenos (Varotto Boccazzi et al., 2017). Identificar los compuestos que producen los hongos resulta importante ya que son uno de los mayores grupos productores de antibióticos (Bérdy, 2012; Kavanagh, 2018). Puntualmente, bajo esta línea de investigación, se ha hallado la molécula α -pirona, proveniente del hongo *Chrysosporium multifidum* aislado de *H. Illucens*, el cual presentó actividad antimicrobiana con una cepa resistente: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Gracias a este hallazgo, se concluyó que la mosca soldado-negra y sus hongos asociados a ella son buenos objetivos en la búsqueda de nuevos tipos de compuestos antimicrobianos relevantes para la medicina humana y animal.(Correa et al., 2019). Por este motivo, en este trabajo, se procederá a aislar e identificar compuestos bioactivos de hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* que presenten actividad antimicrobiana contra *S. enterica* serovar Pullorum ATCC® 13036. Además, utilizar antibióticos naturales de las larvas de la mosca es una alternativa segura para combatir las bacterias en los pollos y evitar la generación de organismos resistentes.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Aislar e identificar preliminarmente nuevas moléculas bioactivas de hongos previamente aislados del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* contra *S. enterica* serovar Pullorum ATCC® 13036™

2.2. Objetivos específicos

- Enfrentar las cepas fúngicas aisladas del tracto digestivo de las larvas de *H. illucens* contra *S. enterica* serovar Pullorum ATCC 13036
- Evaluar la actividad antibacteriana de extracto crudo de la cepa fúngica más activa.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones y sub-fracciones obtenidas para identificar aquellas con mayor capacidad inhibitoria contra *S. enterica* serovar Pullorum.
- Identificar preliminarmente las moléculas bioactivas presentes en las sub-fracciones responsables de la actividad antimicrobiana mediante UHPLC/MS

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de *Hermetia illucens*

3.1.1. Distribución

La mosca soldado-negra o black soldier fly, por sus siglas en inglés BSF (*Hermetia illucens* Linnaeus, 1758; Orden Díptera; Familia Stratiomyidae), es endémica de las regiones tropicales y subtropicales (Sudeste de Asia y América) y también está presente en el sur de Europa (Rusia) y en partes de la península de los Balcanes (Gladun, 2019; Kim et al., 2010; Müller et al., 2017).

3.1.2. Breve descripción morfológica

En la etapa adulta, las moscas *H. illucens* pueden medir hasta 1,6 cm de largo. Tienen cuerpos negros, con reflejos atornasolados de azul a verde. El segundo tergito del abdomen tiene una zona translúcida. De ahí proviene su nombre del latín "*illucens*". La cabeza es ancha y los ojos muy desarrollados. Las antenas miden aproximadamente el doble de la longitud de la cabeza. Las patas son negras con huesos tarsales blancos. Las alas son membranosas; en reposo, se pliegan horizontalmente sobre el abdomen y se apilan (Diclaro & Kaufman, 2018; Savonen, 2005). Por otra parte, El aparato digestivo de *H. illucens* puede dividirse en tres partes: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior, y los tres pueden albergar diferentes comunidades bacterianas (De Smet et al., 2018).

3.1.3. Ciclo de vida

En promedio, las moscas de *H. illucens* viven de 40 a 45 días. En resumen, después de aproximadamente 4 días, una larva emerge de un huevo y pasa por cinco

estadios como larva (L1, L2, L3, L4 y L5) en 13 a 18 días, seguidos de estadios prepupales y pupales de los que emerge la mosca adulta. Los adultos ya no se alimentan (solo toman agua) y viven entre cinco y ocho días, durante los cuales se aparean. La hembra pone de 500 a 900 huevos. Las larvas pueden alcanzar 2.7 cm de longitud y 6 mm de espesor. Presentan coloración beige opaca, con una cabeza pequeña y sobresaliente que contiene piezas bucales masticadoras. Las larvas pasan por seis instares y necesitan aproximadamente de 13 a 18 días para completar su desarrollo. Durante el desarrollo larvario, las larvas de la mosca soldado-negra se alimentan vorazmente. Cuando son adultas no necesitan alimentarse y dependen de las grasas almacenadas desde la fase larvaria (Diclaro & Kaufman, 2018).

3.1.4. Importancia económica - ambiental

Las larvas de *H. illucens* convierten de manera eficiente residuos orgánicos en suplementos nutricionalmente ricos para múltiples aplicaciones. Por lo general, se alimenta de desechos sólidos (vegetales, fermentos, desechos de comida para cerdo y vacunos, algas, entre otros) convirtiéndolos en suplementos ricos en grasas y proteínas para animales (Cifuentes et al., 2020).

Por otro lado, también es capaz de alimentarse de guano, y a pesar de que este tipo de alimentación contiene varias especies de bacterias patógenas (p. ej. *E. coli*, *Salmonella* spp), la larva tiene la capacidad de neutralizarlas. Además, las larvas adquieren otras bacterias de su alimentación pero mantienen su microbioma central, el cual se hereda a través de los estadios larvales, y estas comunidades de microorganismos mejoran su habilidad de digerir los residuos, inactivando a los patógenos asociados a los desechos mediante la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (Cifuentes et al., 2020). En el mismo sentido, la

alimentación de las larvas debe tener un impacto en las asociaciones bacterianas, ya que el microbioma juega un papel importante en la digestión, fisiología e inmunidad (previene la invasión de patógenos) (Cifuentes et al., 2020).

3.2. Generalidades de los hongos

3.2.1. Morfología

Los hongos, pertenecientes al reino fungi, son organismos eucariotas que pueden adoptar una forma filamentosa, formados por vellosidades denominadas hifas, que se ramifican repetidamente detrás de sus puntas, dando lugar a una red denominada micelio. Otros hongos crecen como levaduras unicelulares (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que se reproducen por gemación, y un grupo de hongos, en condiciones estresantes, pueden pasar de levaduriformes a filamentosos. Estos hongos dimórficos incluyen varias especies patógenas para el ser humano. Suelen crecer como células tipo levadura para proliferar en los fluidos corporales, pero se convierten en hifas para invadir los tejidos. Además, los hongos tienen una gama distintiva de componentes de la pared, que suelen incluir quitina y glucanos (polímeros de glucosa con enlaces predominantemente β -1,3 y β -1,6) (Deacon, 2006; Moubasher et al., 2017).

3.2.2. Fisiología

Los hongos son heterótrofos, ya que necesitan compuestos orgánicos predigeridos como fuentes de energía y también como fuente de carbono para el desarrollo celular. La pared celular impide a los hongos ingerir los alimentos por fagocitosis, por ello, absorben nutrientes simples y solubles a través de la pared y la membrana celular. En muchos casos, esto lo consiguen secretando enzimas para

degradar polímeros complejos y luego absorbiendo los nutrientes simples y solubles (Deacon, 2006)

Los hongos tienen una serie de compuestos solubles y de almacenamiento característicos, que incluyen manitol y otros alcoholes de azúcar, trehalosa (el disacárido de la glucosa) y glucógeno (Deacon, 2006).

3.2.3. Reproducción

Los hongos se reproducen sexual y asexualmente y a menudo producen esporas. La forma, el tamaño y otras características de las esporas de hongos varían mucho, las cuales están relacionadas con sus diversas funciones de propagación inactiva o de supervivencia (Deacon, 2006).

3.2.4. Breve Taxonomía

EL reino fungi se divide principalmente en estos filos: Ascomycota, Basidiomycota, Glycophytes, Zygomycota y Chytridiomycota. El filo Ascomycota y Basidiomycota están unificados como Dikaryotes, y los hongos se caracterizan por tener células con núcleos pareados durante una parte de su ciclo de vida. Su pariente cercano parece ser Glomeromycota, un grupo previamente contenido en Zygomycetes. Tanto Zygomycota como Chytridiomycota no son grupos monofiléticos, pero parecen ser "jerarquías paralelas", agrupadas sólo por formas primitivas compartidas. También se muestran las ramas de Microsporidios y Rozella que parecen ser la base de otros hongos. (Bruns, 2006).

3.2.5. Filo Ascomycota

Es el phylum más abundante de los hongos, los cuales se caracterizan por poseer estructuras sexuales llamadas ascos, la cuales contienen esporas sexuales

(ascosporas). Este grupo incluye una amplia gama de especies, como levaduras y hongos filamentosos, de los cuales algunos son patógenos y otros presentan importancia ecológica, ambiental y biotecnológica (Kavanagh, 2018).

Este grupo de hongos es morfológicamente variable, pero como se mencionó anteriormente, comparten una estructura en común llamada ascas, las cuales derivan de estructuras especializadas llamadas apotecios, cleistotecios o peritecios, los cuales encapsulan las esporas y se encargan de su dispersión. Este mecanismo de liberación de esporas puede darse de diversas maneras, como el rompimiento del asco o por la liberación de los conidios a partir de los conidióforos (Deacon, 2006)

En cuanto a su ciclo de vida, estos hongos presentan una alternancia entre fases sexuales/asexuales. En lo que respecta a la fase sexual, está caracterizada por la presencia de ascos que producen ascosporas por medio de meiosis. Por otro lado, en la fase asexual, se caracteriza por la presencia de estructuras llamadas conidióforos, las cuales producen conidiósporas conocidas también como conidios (Bennett & Turgeon, 2016).

Por otra parte, estos hongos pueden ser encontrados en hábitats variados, como en los suelos, humedales, océano y plantas o animales. Algunas especies son saprofitas, contribuyendo en las redes tróficas al descomponer la materia orgánica, mientras que otras son endófitas o causan daño a animales (p. ej. Especies entomopatógenas) y al ser humano. También existen ascomicetos que forman relaciones simbióticas con algas o cianobacterias que forman líquenes; o simbióticamente con plantas (especies micorrícicas, plantas saprofitas) o con insectos (Lecocq et al., 2021; H. Li et al., 2023; You et al., 2015).

Los hongos pertenecientes al filo Ascomycota tienen relevancia en la industria, ya que algunos especímenes, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en la producción de alimentos fermentados como el pan y la cerveza (Wagner et al., 2021). Luego, otro grupo de hongos filamentosos, como *Penicillium* y *Aspergillus*, son empleados para la producción de enzimas (Solomon et al., 2016), metabolitos secundarios (H. Li et al., 2023), antibióticos (X. Yu et al., 2021) y hasta colorantes (de Oliveira et al., 2022).

El filo fúngico Ascomycota se divide en tres subfilos, cada uno con características y propiedades genómicas distintas:

- **Saccharomycotina:** Este subfilo incluye las levaduras que se reproducen por gemación y comprende más de 1000 especies conocidas. Las especies de Saccharomycotina suelen tener genomas más pequeños, menor contenido de guanina-citosina (GC), menor número de genes y mayores tasas de evolución de secuencias moleculares en comparación con otros subfilos. Entre los géneros representativos tenemos a *Saccharomyces*, *Candida* y *Pichia* (Shen et al., 2020).
- **Pezizomycotina:** Comúnmente conocido como hongos filamentosos, Pezizomycotina contiene más de 82.000 especies descritas en 16 clases. Las especies de este subfilo tienen genomas notablemente más grandes (~42 Mb) en comparación con Saccharomycotina y Taphrinomycotina. Pezizomycotina también muestran mayores niveles de divergencia en el orden de los genes. Entre los géneros representativos tenemos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Shen et al., 2020).

- **Taphrinomycotina:** Este subfilo, conocido como levaduras de fisión, consta de aproximadamente 140 especies descritas. Aunque Taphrinomycotina tiene un número mucho menor de especies en comparación con los otros dos subfilos, desempeña un papel importante en el paisaje evolutivo de los Ascomycota. Entre los géneros representativos tenemos *Schizosaccharomyces*, *Taphrina* y *Pneumocystis* (Shen et al., 2020).

En resumen, los ascomicetos son un grupo muy variado de hongos con importancia en la industria, la ecología y la investigación científica. Su diversidad morfológica, ciclo de vida complejo y adaptabilidad a una amplia gama de hábitats los convierten en sujetos de interés para la biotecnología.

3.2.6. Filo Basidiomycota

Estos hongos juegan roles importantes en la ecología, por ejemplo, pueden formar simbiosis con algunos árboles. Incluyen hongos entomopatógenos de diversos insectos, hongos patógenos para plantas como las royas, e incluso algunas levaduras y otros hongos dimórficos como los Tremellomycetes. El filo posee tres características principales: las esporas llamadas basidiomicetos se producen a partir de células llamadas basidiomicetos; las membranas se presentan a través de su estructura de hifas para formar compartimentos estructurales continuos; y se proporcionan clips o esporas en las hifas. Estos microorganismos suelen producir basidiomicetos y, cuando comienza la germinación, las hifas haploides comienzan a crecer y diseminarse al medio ambiente. Posteriormente, cuando otra hifa haploide compatible se recombinen, se convertirá en una hifa diploide, capaz de formar cuerpos fructíferos (Bills & Gloer, 2017; You et al., 2015).

3.2.7. Simbiosis con insectos

Existe un órgano especializado en el almacenamiento de hongos simbióticos llamado micangia, que son cavidades glandulares o invaginaciones cuticulares las cuales protegen al hongo (Correa et al., 2019; Fu et al., 2020). La ubicación y la morfología de los micangios varían según la especie e incluyen la preoral, la mandibular, la elitral, la mesotorácica y muchas otras (You et al., 2015).

3.2.8. Micobiota en insectos

Los órdenes de insectos, Isóptera, Díptera y Coleóptera pueden estar asociados con una diversidad de hongos. Por ejemplo, algunas termitas se encuentran asociadas al hongo *Trichoderma*. Por otro lado, algunos escarabajos se encuentran en simbiosis con algunas especies del género *Fusarium* (Mudalungu et al., 2021). Podemos ilustrar el caso de los escarabajos *Ambrosiodmus*, los cuales se encuentran asociados con el hongo *Flavodon flavus*, el cual ayuda al escarabajo con la degradación de la madera (You et al., 2015). Algo similar ocurre con el hongo *Amylostereum areolatum* en mutualismo con la Avispa *Sirex noctilio*: colaboran en la hidrólisis de la celulosa de la madera para provecho de ambas especies (Fu et al., 2020).

3.2.9. Micobiota de *Hermetia illucens*

En estudios previos, se ha identificado que la comunidad fúngica presente en la mosca soldado-negra, mayormente está compuesta por *Trichosporon jirovecii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania servazzii*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Geotrichum candidum*, *Chrysosporium*

multifidum, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Cyberlindnera* y *Saccharomyces* (Correa et al., 2019; De Smet et al., 2018; Tanga et al., 2021; Varotto Boccazzi et al., 2017). En general, la diversidad fúngica de *H. illucens* varía al alimentarse con un sustrato compuesto por varios tipos de residuos de los cuales se adquiere a los hongos (De Smet et al., 2018; Klüber et al., 2022).

3.3. Metabolitos secundarios de hongos

En líneas generales, los metabolitos secundarios son moléculas no esenciales para el desarrollo del organismo productor. Específicamente, los hongos secretan sus metabolitos secundarios al medio ambiente, conocidos como extrolitos, o incorporados a elementos estructurales de la célula, o pueden permanecer unidos a la célula (Bills & Gloer, 2017). No obstante, los metabolitos secundarios tienen funciones importantes para los hongos. Por ejemplo, algunas especies de hongos producen pigmentos para protegerse de los rayos UV. Producen micotoxinas cuando infectan a las plantas, sintetizan compuestos antibacterianos en confrontaciones con otras bacterias. Asimismo, pueden exhibir actividades antibacterianas, antifúngicas o antitumorales, subrayando su versatilidad en diversos procesos biológicos (Keller, 2019)

Los metabolitos secundarios se clasifican acorde a los metabolitos primarios que se emplean como bloques de construcción en las diferentes vías metabólicas. Entre las clases de metabolitos secundarios de hongos, tenemos los policétidos derivados de acyl-CoAs, los terpenoides derivados de acyl-CoAs, los péptidos no ribosomales, los péptidos ribosomales codificados por el núcleo y las moléculas de origen biogénico mixto que surgen de vías híbridas (Bills & Gloer, 2017; Keller, 2019).

Los genes encargados de la biosíntesis de metabolitos secundarios están agrupados en clusters, conocidos como *Biosynthetic gene clusters* (BGC). Éstos se encargan de codificar las enzimas y proteínas, como sintasas, enzimas adaptativas y factores de transcripción específicos que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios específicos (Keller, 2019). Estas enzimas emplean bloques de construcción derivados de Acyl-CoA/malonilo (Poliketide syntase, PKS) o aminoácidos (Non-ribosomal peptide synthase, NRPS) para sintetizar el conjunto de metabolitos. Adicionalmente, son enzimas multimodulares que tienen similitudes en su arquitectura y mecanismos de acción, pero varían dependiendo del tipo de metabolito secundario a sintetizar. Un módulo enzimático típico, como mínimo, posee 3 dominios: uno de adenilación/trasporte, un dominio de extensión y un dominio de condensación (Brakhage, 2013).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios es regulada por estímulos químicos o ambientales y coordinada con el desarrollo y la morfogénesis del organismo productor. En condiciones *in vitro*, los genes que codifican las principales enzimas para la síntesis de metabolitos secundarios a menudo pueden ser silenciados y no expresarse en un experimento de laboratorio (Brakhage, 2013; Chiang et al., 2016). Por otro lado, algunos metabolitos se producen fácilmente en el cultivo, mientras que otras vías permanecen silenciosas. Esta laguna de conocimiento ha sido un factor clave que limita la identificación de las funciones naturales de los metabolitos secundarios (Bills & Gloer, 2017). Se han identificado miles de metabolitos secundarios provenientes de hongos, los cuales están depositados en compendios y bases de datos (GNPS, NIST, DNP, etc.) y muchos de ellos se asocian con cierta actividad biológica. El estudio y la investigación de los

metabolitos secundarios de hongos continúan siendo un campo en constante evolución, ofreciendo una amplia gama de compuestos bioactivos con potencial farmacéutico y biotecnológico. (Bills & Gloer, 2017).

3.4. Métodos de evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana

3.4.1. Difusión en disco en agar

En este conocido procedimiento, las placas de agar se inoculan con un microorganismo de prueba. En principio, se colocan sobre el agar discos de papel de filtro, de unos 6 mm de diámetro, que contienen el compuesto de prueba a una concentración deseada y seguidamente las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Lo que sucede después es que el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba, midiéndose al final diámetros de los halos de inhibición. Dependiendo del rango de la medida de los halos, se proporciona una jerarquía cualitativa, clasificando las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes. Este ensayo de difusión en disco ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo coste, la capacidad de analizar un enorme número de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados obtenidos (Balouiri et al., 2015; Choi et al., 2018) .

3.4.2. Difusión en pozos de agar

El método de difusión en pozo de agar se utiliza ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana extractos o en cocultivo para evaluar posibles antagonismos entre hongos y bacterias (Correa et al., 2019). De forma similar al procedimiento utilizado en el método de difusión en disco, la superficie de la placa

de agar se inocula por extensión con el microorganismo de prueba. A continuación, se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 2 a 3 mm con un sacabocado, la punta de una jeringa estéril o un tip, y se introduce en el pozo generado un volumen entre 10 – 100 μ L del de extracto a la concentración deseada o un número determinado de esporas fúngicas. A continuación, se incuban las placas de agar en condiciones adecuadas según el microorganismo de prueba. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada (Balouiri et al., 2015).

3.4.3. Agar plug

El método de difusión en bloque de agar se utiliza exclusivamente para evaluar el antagonismo entre microorganismos y es similar al método de difusión de discos de papel. Consiste en cultivar en un agar apropiado de la especie de interés mediante extensión en la superficie de la placa. Durante su crecimiento, las células, ya sean fúngicas o bacterianas, secretan moléculas que se difunden en el medio de agar. Tras la incubación, se corta asépticamente un bloque o cilindro de agar con un sacabocado estéril. A continuación, se deposita en la superficie de agar de otra placa previamente inoculada por extensión con el microorganismo patógeno de prueba. Las sustancias se difunden desde el bloque al nuevo medio de agar. Posteriormente, la actividad antimicrobiana de las moléculas secretadas por el microorganismo se detecta por la aparición de los halos de inhibición alrededor del bloque de agar (Balouiri et al., 2015; Chovanová & Zámocký, 2016; Ortlieb et al., 2021).

3.4.4. Bioautografía - Cromatografía en capa fina (TLC)

La bioautografía es una técnica analítica ampliamente utilizada para detectar y localizar compuestos con actividad biológica presentes en una mezcla compleja como extractos de plantas, microorganismos o cultivos de células. Este método combina la cromatografía en capa fina (TLC) con pruebas de actividad biológica, lo que permite la identificación de zonas con actividad antimicrobiana donde están presentes moléculas con propiedades similares de migración. La bioautografía se puede realizar de tres maneras, las cuales son: Por difusión en agar, bioautografía directa o por punto y en capa fina desarrollada (Balouiri et al., 2015; M. Wang et al., 2021).

En esta metodología, una placa TLC previamente sembrada con la muestra a evaluar por punto o desarrollada en capa fina mediante gradiente de solventes, se cubre con un medio de agar Mueller-Hinton con bacterias inoculadas por incorporación (M. Wang et al., 2021). El uso de este agar permite una mejor adherencia a la placa TLC y una mejor difusión de los compuestos antibióticos en comparación a otros medios, permitiendo visualizar las zonas de inhibición (Nassar et al., 2019). Tras la incubación en condiciones adecuadas, dependiendo del microorganismo de prueba, se realiza la revelación aplicando una solución con cualquier derivado de sales de tetrazolio, como el MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Las deshidrogenasas de los microorganismos viables metabolizan las sales de tetrazolio, produciendo formazán, un precipitado de color púrpura en las zonas de crecimiento. Gracias a este contraste, se pueden observar halos de inhibición del crecimiento, que se

observan como zonas amarillas bien definidas (Correa et al., 2019; M. Wang et al., 2021).

3.4.4.1 Difusión en agar

En la Bioautografía por difusión en agar, la placa TLC con la mezcla de compuestos a evaluar, desarrollada por gradiente de solventes o depositada por punto, se coloca boca abajo sobre una placa Petri sembrada por extensión con el microorganismo patógeno de interés, se deja un tiempo determinado para que los compuestos presentes difundan en el agar y luego se retira la placa para proceder con la incubación, crecimiento e inhibición. (Balouiri et al., 2015; M. Wang et al., 2021).

3.4.4.2 Bioautografía directa

La bioautografía directa (DB) es el método más extendido en su uso, en el cual se rocía caldo con la suspensión de microorganismos patógenos directamente sobre la placa de TLC desarrollada (TLC – DB) o por punto (Dot-blot – DB), o se sumerge la misma en la suspensión bacteriana. Seguidamente, se procede a la incubación bajo una temperatura apropiada para el microorganismo patógeno. Finalmente, se revela la formación del halo de inhibición de crecimiento al rociar el reactivo MTT (Balouiri et al., 2015; M. Wang et al., 2021).

3.4.4.3 Bioautografía por superposición de agar

La bioautografía por superposición de agar es un híbrido entre los dos métodos anteriores. Se recubre uniformemente agar fundido tibio antes de su solidificación (~40-45°C) inoculado con microorganismos a una concentración estandarizada sobre la placa TLC desarrollada (TLC – *Agar overlay bioautography*) o por punto (Dot-blot – *Agar overlay bioautography*) con el compuesto a evaluar.

Después de la solidificación, se incuba por 18 a 24 horas a 30-37° C y se tiñe con la solución de sales de tetrazolio. Luego de un tiempo se aprecian las zonas de inhibición en caso se trate de un compuesto con actividad antibacteriana contra el microorganismo patógeno de interés correctamente (Balouiri et al., 2015; M. Wang et al., 2021).

3.4.4.4 Variantes de la Bioautografía

Como se ha mencionado, existen dos variaciones de esta técnica, las cuales son bioautografía con placa desarrollada (TLC-Bioutography) y Bioautografía por punto (Dot-Blot Bioautography).

Bioautografía por punto

En esta técnica, los compuestos no son desarrollados en la placa TLC. En este caso, se aplica una mezcla de compuestos o extractos crudos disueltos en un solvente adecuado, que contienen los compuestos de interés, directamente en un punto de la placa TLC. Luego que el solvente evapora, se continúan con los pasos de la bioautografía explicados en los puntos 3.4.4.1 – 3.4.4.3. Asimismo, esta técnica permite ahorrar tiempo, sin embargo, los resultados son solo preliminares, ya que al estar en una mezcla los compuestos, éstos pueden actuar de forma antagónica o sinérgica, enmascarando la actividad real de los compuestos. A pesar de ello, esta prueba permite discernir si cierta muestra dada, sea extracto vegetal, bacteriano y/o fúngico, amerita experimentos adicionales. También, la bioautografía por punto permite cuantificar el poder antibacteriano de un compuesto o mezcla de compuestos al medir el tamaño del diámetro del halo de inhibición. Esta prueba da valores comparables y es rápida para realizar el *screening* en múltiples muestras en estudios de bioactividad y en fraccionamientos bio –

guiados, al complementarse de técnicas de cromatografía líquida preparativa, obteniendo mayores rendimientos (Choma & Jesionek, 2015; Marston, 2011).

Bioautografía con placa desarrollada.

En esta técnica, los compuestos son desarrollados en la placa TLC con una fase móvil adecuada para su separación. En este método, se aplica una mezcla de compuestos o extractos crudos disueltos en un solvente adecuado, que contienen los compuestos de interés, en un extremo de la placa TLC. Luego que el solvente evapora, se procede con la elución y, por último, se continúan con los pasos de la bioautografía explicados en los puntos 3.4.4.1 – 3.4.4.3. La bioautografía con la placa TLC desarrollada permite localizar los componentes activos en matrices complejas de manera eficiente al evaluar los compuestos individuales y obtener información más precisa, aunque se obtiene una cantidad limitada de material e intrínsecamente, consume más tiempo por el proceso de desarrollo de la placa TLC. (Jesionek et al., 2015; Marston, 2011).

3.4.5. Microdilución en caldo

La microdilución en caldo es uno de los métodos más básicos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana, la cual ha sido estandarizada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El procedimiento consiste en preparar diluciones dobles del compuesto a evaluar o antibiótico de referencia (por ejemplo, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/mL) en caldo Muller – Hinton dispensado 100 µL en una placa de 96 pocillos. A continuación, cada pozo se inocula con la bacteria de interés preparada en MHB ajustada a la escala de 0,5 McFarland (entre 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). Después la placa se incuba en las condiciones adecuadas acorde a la bacteria. Con ayuda de esta metodología se puede cuantificar la concentración

media máxima inhibitoria (IC_{50}), la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). La IC_{50} es la concentración del compuesto bioactivo que inhibe el 50% del crecimiento del organismo. Se puede detectar mediante un lector de placas espectrofotométrico o mediante colorimetría, mayormente empleando sales de tetrazolio. Entre estas sales, tenemos al bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) y al 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT), que al igual que en la técnica de bioautografía, producen un precipitado purpura (MTT) o anaranjado (XTT). La MIC es la menor concentración del compuesto bioactivo que inhibe el total crecimiento del organismo, detectada a simple vista. Por otro lado, la determinación de la concentración mínima bactericida (MBC). Se define como la menor concentración de agente antimicrobiano necesario para eliminar al 99.9% del inóculo final después de la incubación con el antimicrobiano a evaluar. Los valores de la MBC se determinan mediante un subcultivo de cada concentración que generó una MIC en agar libre del agente antimicrobiano después de 24 h de incubación (Balouiri et al., 2015; Choi et al., 2018; Pereira et al., 2013).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Material biológico

Para el estudio, se utilizaron cepas de hongos aislados previamente del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* criadas de acuerdo con el protocolo estándar establecido en el bioterio del laboratorio LMI-LAVI UPCH-IRD, bajo condiciones controladas de temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 70%, un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y alimentadas con guano de gallina (Correa, 2018) y mantenidos tanto en medios de cultivo sólido como en conservación criogénica. Las cepas se cultivaron en agar Sabouraud (SBA) para su reactivación. En la Tabla 1 se presentan las especies de hongos levaduriformes y filamentosos aisladas previamente de *H. illucens*.

Tabla 1

Especies de hongos aisladas previamente de H. illucens

Hongos levaduriformes	Hongos filamentosos
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Ascospaera variegata</i>
<i>Candida pseudorugosa</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Trichosporonales</i>	<i>Chrysosporium multifidum</i>
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	

Además, se incluyó en el estudio la bacteria *Salmonella entérica serovar pullorum* ATCC® 13036 (obtenida de Microbiologics - GenLab), seleccionada como representante del agente patógeno.

4.2. Criopreservación de *S. enterica* serovar Pullorum y reactivación de las cepas fúngicas previamente aisladas

Para la criopreservación de *S. enterica* serovar Pullorum, se prepararon 25 crioviales. Para ello, a partir de un cultivo de 18 horas de *S. enterica* serovar Pullorum, se ajustó a la densidad de 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) utilizando caldo cerebro corazón (BHI). Posteriormente, se tomó una alícuota de 500 μ L de este cultivo y se mezcló con glicerol para alcanzar una concentración final de glicerol del 25%. Los crioviales resultantes se almacenaron en una ultracongeladora a -80°C . Luego, para la reactivación, los crioviales conteniendo *S. enterica* serovar Pullorum y los crioviales de hongos levaduriformes aislados previamente, se descongelaron a temperatura ambiente. Los cultivos de *S. enterica* serovar Pullorum se sembraron en agar Tripticasa Soya (TSA) y se incubaron a 37°C por 18 horas. Las levaduras se sembraron en agar Saboudaud (SBA) y se incubaron a 30°C por 7 días. Por otro lado, para reactivar los hongos filamentosos, se realizaron repiques a partir de cultivos reservados en tubos y placas con agar papa dextrosa (PDA). Con ayuda de un asa en L, se extrajeron las hifas y se sembraron por picadura en 4 puntos dentro de una placa con agar Sabouraud. Posteriormente se incubaron a 30°C por 7 días.

Para la criopreservación de hongos filamentosos, se empleó un cultivo previamente incubado por 7 días con esporulación en curso. Bajo condiciones estériles en una cabina de seguridad, se añadió 1 mL de glicerol al 50% directamente sobre la placa de cultivo. Luego, utilizando un asa de Drigalsky estéril, se raspó la superficie, liberando así las esporas. Seguidamente, con una micropipeta de 1000 μ L, se recuperó el homogenizado y se vertió en un criovial, para luego almacenarlo en una ultracongeladora a -80 °C (Nickles et al., 2021).

4.3. Pruebas de antagonismo

Para evaluar el antagonismo entre las cepas fúngicas levaduriformes aisladas del tracto digestivo de *H. illucens* y *S. enterica* serovar Pullorum, se utilizó el método del *agar plug*, mientras que, para cepas filamentosas, se utilizó el método de pozo en agar.

4.3.1. Pruebas de antagonismo en cepas fúngicas levaduriformes

Para realizar este procedimiento, se inoculó una asada de cada levadura en un tubo individual de caldo Sabouraud (SBB) y se incubó por 24 horas a 30 °C. Posteriormente, se realizó un recuento celular en una cámara de Neubauer para ajustar la concentración a 10^6 UFC/ml en un volumen de 15 mL de agar SBA. Luego, se tomó la alícuota calculada y se incorporó los 15 mL de agar Sabouraud derretido en placas Petri de 90 mm, las cuales se incubaron a 30°C por 24 horas.

De manera paralela, se realizó un cultivo por extensión de *S. enterica* serovar Pullorum en agar TSA a una concentración de 10^6 UFC. Posteriormente, se añadieron discos de 8 mm obtenidos del cultivo de levaduras anterior con un sacabocado estéril. Seguidamente, todo se incubó a 37° C durante 24 horas. La

actividad antibacteriana se detectó por la formación de un halo de inhibición. Los controles positivos se realizaron con discos de agar SBA conteniendo tetraciclina a una concentración de 22,5 µg/mL. Todos los experimentos de antagonismo realizados utilizando el método de *agar plug* se realizaron por triplicado.

4.3.2. Pruebas de antagonismo en cepas fúngicas filamentosas

Para realizar este procedimiento, las cepas fúngicas filamentosas se enfrentaron a *S. enterica* serovar Pullorum mediante el método de pozo en agar. Para ello, se empleó un cultivo previamente incubado por 7 días con esporulación en curso. Se colocó bajo cabina de seguridad y seguidamente se añadió 20 mL de detergente Tween 20 estéril al 0.01% directamente sobre la placa. Luego, con ayuda de un asa de Drigalsky estéril, se raspó la superficie, liberando así las esporas, que luego se colectaron y se contaron en cámara de Neubauer. Seguidamente se realizó una solución de 10^3 esporas/mL en suero fisiológico estéril. Posteriormente se inoculó 10 µL de esta concentración (~10 esporas) en un pocillo realizado con una jeringa estéril de 1 mL al centro de una placa de SBA. Seguidamente, se incubaron las placas por 5 días a 30°C. Después de ese periodo, se inoculó alrededor del hongo utilizando un hisopo estéril la bacteria *S. enterica* serovar Pullorum a partir de un cultivo líquido de 18 horas, ajustado a una concentración de 10^6 UFC/ml. Seguidamente, se incubaron los cocultivos por 24 horas para poder observar los halos de inhibición. Luego, se midió el halo de inhibición y el crecimiento del hongo, y se halló el potencial antibacteriano (PA) mediante la fórmula DI/DH , donde DI es el diámetro de inhibición y DH, el diámetro del hongo. Los hongos con un PA mayor a la unidad fueron considerados como positivos para la actividad antibacteriana mientras que los hongos con un valor igual a la unidad se

consideraron como negativos para la actividad antibacteriana. Como control positivo se empleó 30 µg de tetraciclina, la cual se inoculó en el pocillo central de la placa con SBA. Este procedimiento se realizó por triplicado.

4.4. Preparación de cultivo fúngico en medio líquido

El hongo que presentó actividad antibacteriana fue empleado para el cultivo líquido. Primero, se realizó un pre – cultivo, inoculando 5×10^4 esporas/mL en 100 mL de caldo Sabouraud (BD-Difco) y se incubó a 30°C por 3 días a 150 rpm en una incubadora con agitador orbital (Benchtop TOU-120). Luego, se repartieron 50 ml del pre – cultivo en dos matraces con 450 mL de caldo Sabouraud, obteniendo 500 mL por matraz. Estos se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 7 días obteniéndose aproximadamente 12 litros de cultivo líquido.

4.5. Extracción líquido – líquido a partir de cultivo fúngico

Después de los 7 días de incubación del cultivo fúngico, el micelio se separó mediante filtración al vacío. Posteriormente, 500 mL de caldo se mezclaron por separado con los solventes orgánicos diclorometano (grado HPLC – JT Baker) y acetato de etilo (grado HPLC – JT Baker) en proporción 1:1 (v/v) utilizando peras de decantación de 2L. Estas mezclas se agitaron durante 30 segundos y se dejaron reposar durante 15 minutos para facilitar la formación de fases: la fase orgánica, que contenía los metabolitos y la fase acuosa, que contenía el cultivo. Luego, se descartaron las fases acuosas, se recolectaron las fases orgánicas y se concentraron utilizando un rotavapor (R-114 Buchi). Seguidamente, se depositaron por separado en viales previamente pesados y se secaron para obtener los extractos crudos. Estos extractos crudos fueron pesados y almacenados a 4 °C para su uso posterior. El

proceso de extracción se llevó a cabo por triplicado para garantizar la extracción completa de los metabolitos. Se evaluó cada extracto crudo obtenido para confirmar su actividad antimicrobiana por bioautografía, MIC e IC₅₀ para poder dilucidar cuál de los solventes tendría una mejor capacidad extractiva y mayor actividad antimicrobiana. Luego de esta evaluación, se utilizó el solvente orgánico con mayor actividad para realizar las extracciones, siguiendo los mismos procedimientos descritos en esta sección.

4.6. Extracción alcohólica.

Se procedió a la liofilización de 500 mL de caldo filtrado durante 7 días a una presión de 0.12 mbar y a una temperatura de -40°C utilizando una liofilizadora Christ. Una vez que el material estuvo completamente seco, se transfirió el liofilizado a un matraz al que se le añadieron 200 mL de metanol absoluto (grado HPLC - JT Baker). Posteriormente, se sometió la mezcla a ultrasonidos durante 10 minutos y se filtró. Luego, el metanol se evaporó utilizando un rotavapor para obtener el extracto metanólico.

4.7. Evaluación de la actividad antibacteriana

En este punto se describen los métodos utilizados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos a partir del cultivo fúngico. Para ello, se emplearon dos metodologías: bioautografía por superposición de agar y microdilución en caldo. Estos métodos permitieron determinar tanto la presencia de actividad antimicrobiana como la concentración mínima inhibitoria de los extractos frente a la bacteria patógena *Salmonella enterica* serovar Pullorum.

4.7.1. Bioautografía por superposición de agar

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de bioautografía por punto por superposición de agar (*Dot-blot – Agar overlay bioautography*). Para este procedimiento, se colocaron en placas de aluminio con gel de sílice 60 F264 (Merck) de 7 x 3 cm, dos puntos conteniendo 200 µg de extracto (acetato de etilo, diclorometano o metanol) mientras que en otra placa se añadieron 0,25 µg de tetraciclina como control. A continuación, las placas TLC fueron colocadas en placas Petri de 90 mm y se sometieron a esterilización mediante luz ultravioleta durante 15 minutos. Posteriormente, se distribuyeron 3 mL de agar Müller-Hinton (MHA, BD-Difco) con *S. enterica* serovar Pullorum a una concentración de 1×10^7 UFC /mL en cada placa. Las placas de Petri fueron incubadas a 37 °C durante 18 horas. La revelación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la aspersión de una solución de 5 mg/ml de MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio, Sigma-Aldrich) en PBS 0.01M (pH 7,4) sobre el agar, seguido de una incubación a 37°C durante 3 horas. Las zonas de inhibición se evidenciaron en color amarillo (color normal de la solución de MTT) sobre un fondo violeta, color característico del formazán, producido por el metabolismo de las sales del tetrazolio mediado por las deshidrogenasas bacterianas (Correa et al., 2019; M. Wang et al., 2021). Seguidamente, se tomaron las medidas de los halos en inhibición para cuantificar la actividad del extracto. El mismo método se empleó para evaluar la actividad de las fracciones y subfracciones obtenidas de los ensayos cromatográficos.

4.7.2. Microdilución en caldo

La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se llevaron a cabo mediante microdilución en caldo (Wiegand et al., 2008). Los extractos crudos fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración stock de 800 mg/mL y se prepararon diluciones seriadas placas de 96 pocillos, combinando los extractos disueltos en DMSO con el caldo Mueller-Hinton II (MHBII) hasta alcanzar un volumen final de 50 µL. Posteriormente, se añadieron 50 µL de una suspensión previamente preparada de *S. enterica* serovar Pullorum (cultivada por 18 horas a 37°C en caldo Müller Hinton) a las diluciones. La densidad bacteriana final se ajustó a 5x10⁵ UFC/mL. Las concentraciones finales de los extractos en cada pocillo se mantuvieron en un rango entre 16 y 0.03 mg/mL, mientras que la concentración final de DMSO se mantuvo por debajo del 2%. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se realizó la lectura de la densidad óptica (OD) a 595 nm. Como control positivo, se empleó tetraciclina en un rango de concentraciones de 8–0.015 µg/mL. Se llevó a cabo un análisis de regresión logística de 4 parámetros - Curva dosis respuesta para determinar la IC₅₀ de los compuestos en el programa Graph Pad Prism 8. La MIC se determinó de manera visual, como el ultimo pocillo correspondiente a la concentración que no presentó turbidez. Estos análisis fueron realizados por triplicado.

4.8. Identificación de la cepa HGU11_3

Luego de realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana descrita en el punto anterior, se procedió con la identificación molecular del hongo filamentoso con actividad contra *S. enterica* serovar Pullorum a nivel de especie mediante

secuenciamiento de ADN. Este procedimiento se realizó mediante un servicio por terceros por parte de la empresa BTS Consultores (Lima, Perú), quienes realizaron la extracción de gDNA fúngico, síntesis de oligos, y la amplificación y purificación de los productos PCR empleando los siguientes marcadores moleculares: La región ITS1, 5.8s e ITS2 empleando los primers ITS5 (Forward primer 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (Reverse primer 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'); el gen de β -tubulina (*benA*), empleando los primers Bt2a (Forward primer 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2B (Reverse Primer 5'ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC 3')(Alshehri & Palanisamy, 2020; Glass & Donaldson, 1995) y el gen de Calmodulina (*CaM*), empleando los primers cmd5 (Forward primer 5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') y cmd6 (Reverse primer 5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3')(Alshehri & Palanisamy, 2020; Hong et al., 2006). El secuenciamiento de la región ITS fue tercerizado a la empresa Macrogen (Corea), mientras que el secuenciamiento de las secuencias codificantes (*benA* y *CaM*) fue realizado por la empresa Sangon (China).

El análisis se realizó mediante blastn (Zhang et al., 2000) empleando las bases de datos rRNA/ITS database y nt database.

4.9. Fraccionamiento mediante MPLC

El extracto crudo de acetato de etilo se separó utilizando cromatografía líquida de mediana presión (MPLC) sobre gel de sílice en fase normal, utilizando un gradiente de diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) (de 0:1 a 1:0).

En primer lugar, se preparó un depósito sólido del extracto crudo. Este se disolvió en acetato de etilo y posteriormente, se añadió gel de sílice 60 F254 en fase normal hasta que fuera absorbido todo el extracto. Posteriormente, se secó completamente utilizando un rotavapor.

Para el proceso de fraccionamiento, se preparó una columna preparativa de vidrio de 47,2 mm x 205 mm, la cual fue empaquetada con 90 gramos de gel de sílice 60 F254 en fase normal. La columna se equilibró cuidadosamente con diclorometano para asegurar la eliminación de aire y facilitar el flujo uniforme del solvente durante la elución. Se utilizó una bomba Buchi C-605 (Controlador C-615) para este proceso.

A continuación, el depósito sólido que contenía el extracto se añadió a la parte superior de la columna, se tapó con sílice gel y se inició el fraccionamiento. El proceso de elución se realizó utilizando un sistema de gradiente de diclorometano: metanol, comenzando con una proporción de 100% de diclorometano y aumentando gradualmente la proporción de metanol hasta alcanzar el 100% de este último solvente (1:0 DCM:MeOH a 0:1 DCM:MeOH). Este método de gradiente permitió una separación eficaz de los componentes según su polaridad. Posteriormente, las fracciones fueron colectadas en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (TLC). Para determinar la agrupación de las fracciones, se analizaron las bandas migratorias bajo luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm. Las fracciones con perfiles de TLC similares se combinaron y se concentraron por evaporación de los solventes, preparándolas para análisis y evaluaciones posteriores.

4.9.1. Subfraccionamiento mediante MPLC

Continuando con el análisis y la purificación de los compuestos bioactivos, las fracciones que mostraron mayor actividad antimicrobiana en los análisis previos fueron sometidas a un proceso de subfraccionamiento para aislar y caracterizar los componentes más específicos y activos. Para ello, se preparó un depósito sólido de la fracción activa, acorde con la siguiente metodología: Se disolvió la fracción a purificar con acetato de etilo y se transfirió a un balón de 50 ml. Seguidamente, se pesó 1.5 gramos de celita, un material auxiliar que facilita la adsorción y distribución uniforme de la fracción en la columna de cromatografía. Posteriormente, la mezcla se evaporó con ayuda del rotavapor (KnF) para eliminar completamente el solvente. A continuación, la fracción se transfirió a un mortero donde se homogenizó para asegurar la distribución uniforme del compuesto con la celita. El depósito sólido resultante se colocó dentro de un cartucho especial para muestras, luego se compactó el material con una frita en la base, se colocó una capa de arena pura en la parte superior y nuevamente se colocó otra frita para finalmente cerrar el cartucho con su respectiva tapa. Seguidamente, el depósito sólido se ubicó sobre una columna prefabricada de sílica gel (25 g.) y se procedió con el subfraccionamiento en un gradiente de DCM:MeOH (100% : 0% a 0% : 100%) utilizando el equipo puriFlash 520 xs Plus, el cual fue previamente acondicionado para garantizar la purificación efectiva (purga y equilibración). Finalmente, se agruparon las fracciones conforme se describió anteriormente, realizando un seguimiento mediante TLC. En este caso, se examinó cada tubo, agrupándolos acorde a su migración visualizando las bandas bajo luz ultravioleta (254 y 366 nm).

4.10. Análisis UHPLC/MS

Se realizó el análisis UHPLC/MS para determinar que compuestos preliminares se podrían encontrar en cada fracción y subfracción activa. Para ello, se empleó el equipo UHPLC acoplado al espectrofotómetro de masas.

4.10.1. Parámetros de UHPLC

El análisis por cromatografía líquida fue realizado en un equipo Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 equipado con un detector de arreglo de diodos, un horno de columna y un autosampler. Se utilizó una columna Luna Omega C18 (150 x 2,1 mm, 1,6 µm) de Phenomenex, manteniendo una temperatura constante de 25 °C. La cantidad inyectada fue de 2 µL con un flujo de 0,3 mL/min. Se empleó acetonitrilo (0.1% ácido fórmico) y agua (0.1% ácido fórmico) como fases móviles, en un gradiente de 5:95 - 1:0 - 5:95 ACN:H₂O. Se aplicaron 10 minutos de tiempo de equilibrio entre cada inyección (muestra).

4.10.2. Parámetros de HR-ESI-MS

Se adquirieron los datos espectrométricos utilizando un espectrómetro de masas Q Exactive Plus de Thermo Scientific, el cual estaba equipado con una fuente de ionización de tipo electrospray (ESI) y un analizador tipo Orbitrap. El equipo se utilizó en modo positivo. Se registraron espectros de masas completos en un rango desde 130 m/z hasta 1600 m/z, con una resolución de 70000 ppm.

4.10.3. Procesamiento de la data

La data fue registrada usando el software Xcalibur®. Luego, los espectrogramas en formato. raw se convirtieron en formato mzML mediante el programa MSConvert para ser procesados en el programa MZmine 3. Luego, los archivos generados fueron subidos a GNPS para realizar un análisis de redes moleculares basadas en características (<https://gnps-quickstart.ucsd.edu/featurebasednetworking> - Featured Based Molecular Networking – FBMN) para la elucidación preliminar de las posibles estructuras químicas.

4.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en las pruebas de bioautografía (crudo, fracciones y sub-fracciones contra *S. enterica* serovar Pullorum) fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar de la medición del halo de inhibición, realizado por triplicado. Luego, se llevó a cabo la prueba de ANOVA de una vía, para determinar si al menos alguna de las fracciones o sub-fracciones diferían significativamente de las demás, seguida de un análisis post hoc de Bonferonni para evaluar las diferencias significativas específicas de las fracciones/sub-fracciones. Además, se realizó un análisis de regresión logística de cuatro parámetros (curva dosis-respuesta: Log [inhibidor] vs. %Inhibición) para determinar el valor de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) de los extractos crudos, y se calcularon los intervalos de confianza correspondientes. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.

V. RESULTADOS

En el material suplementario, Figura S1, se detallan los procedimientos correspondientes a las pruebas de antagonismo, la selección del hongo activo, el aislamiento biodirigido y el análisis de masas. Estos procesos han sido esquematizados para comprender cada etapa del trabajo, desde la identificación del hongo hasta la caracterización de sus metabolitos.

5.1. Pruebas de antagonismo entre los hongos y *S. enterica* serovar

Pullorum ATCC 13036

En las pruebas de antagonismo realizadas, se utilizaron hongos previamente aislados del tracto digestivo de la larva de la mosca *Hermetia illucens*. Estas pruebas permitieron identificar al hongo *Aspergillus chevalieri*, codificado como HGU11_3 como único hongo con actividad antibacteriana con un potencial antimicrobiano (PA) de 1.5 contra la bacteria patógena para pollos *S. enterica* serovar Pullorum ATCC 13036 (Figura 1a). Los demás hongos presentaron actividad antibacteriana nula.

5.2. Identificación de la cepa HGU11_3

A partir de los resultados descritos en el punto 5.1, se decidió continuar el análisis con el hongo filamentosos cepa HGU11_3. Como primer paso, se realizó la identificación de la especie del hongo utilizando secuenciamiento molecular. A partir de los resultados se identificó al hongo como *A. chevalieri* al comparar las secuencias mediante el análisis blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y de los genes de β -Tubulina (Tabla S1) y calmodulina (Tabla S2). La identificación

por ITS no fue concluyente (Tabla S3) a pesar de emplear la base de datos de secuencias fúngicas curadas (rRNA/ITS databases), por lo que se empleó adicionalmente los genes para β -Tubulina y Calmodulina, obteniendo el 100% de identidad con ambos genes para *A. chevalieri*, respectivamente. Las coincidencias del análisis se encuentran en la sección suplementaria, asimismo, se adjuntan las secuencias ITS, β -tubulina y Calmodulina empleadas en el análisis (Tabla S4).

Posteriormente, se investigaron las características microscópicas del hongo *A. chevalieri* mediante la técnica del microcultivo cuyos detalles se pueden apreciar en la Figura 1b. Durante esta observación se confirmó que el hongo es de tipo filamentoso, compuesto por hifas hialinas tabicadas. Del cuerpo principal del hongo emerge un conidióforo recto que termina en una vesícula. Alrededor de esta vesícula se encuentran estructuras llamadas fiálides, de las cuales se originan conidios esféricos que se organizan en cadenas largas (Correa, 2018).

5.3. Cultivo en masa del hongo *A. chevalieri*

A partir del hongo *A. chevalieri* previamente identificado, se llevó a cabo la producción de 10 litros de cultivo líquido (Figura 1c). Este cultivo fue sometido a un proceso de filtración (Figura 1d) con el objetivo de separar el micelio del sobrenadante. Este último contiene los metabolitos exudados por el hongo. Finalmente, este sobrenadante se conservó para su posterior extracción de metabolitos secundarios.

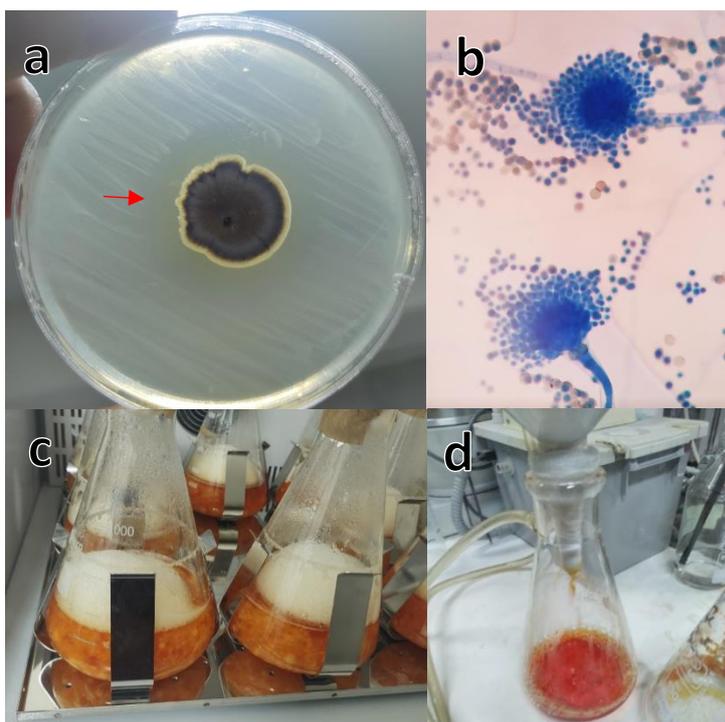


Figura 1. Prueba de antagonismo, cultivo y filtración de *A. chevalieri*. **a.** Halo de inhibición de *A. chevalieri* contra *S. enterica* serovar Pullorum. Diámetro de inhibición: 3.74 cm, Diámetro del crecimiento fúngico: 2.47 cm; Potencial antimicrobiano = $DI/DH = 1.52$; **b.** Foto microscópica (40x) de *A. chevalieri*.; **c.** Cultivo líquido; **d.** Filtración del cultivo líquido.

5.4. Extracción de metabolitos secundarios a partir de cultivo líquido de *A. chevalieri*.

Se realizó la extracción de metabolitos secundarios presentes en el sobrenadante obtenido en el punto 5.3, utilizando los solventes orgánicos diclorometano (DCM), acetato de etilo (EtOAc) y metanol (MeOH). Este proceso comenzó con la mezcla del sobrenadante con cada uno de los solventes orgánicos (Figura 2). Luego de esta mezcla, se observó la formación de dos fases distintas (acuosa y orgánica) características de cada solvente.

Posteriormente, las fases orgánicas DCM, EtOAc y MeOH fueron cuidadosamente extraídas y sometidas a evaporación utilizando un evaporador rotativo. Este paso permitió concentrar los extractos, lo que condujo a la obtención de tres extractos distintos, codificados como extracto DCM, extracto EtOAc y extracto MeOH, con pesos de 927 mg, 1853 mg y 3200 mg respectivamente. Estos extractos fueron almacenados a 4°C hasta su posterior uso, asegurando así su conservación adecuada.

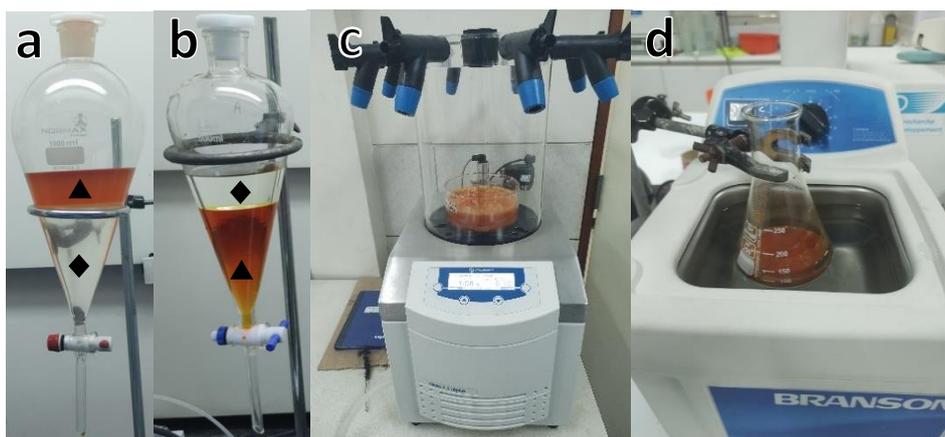


Figura 2. Extracción de metabolitos de *A. chevalieri*. **a.** Extracción líquida-líquida con DCM del caldo de *Aspergillus chevalieri*; **b.** con EtOAc; **c.** Liofilización del caldo; ▲: fase acuosa; ◆: fase orgánica; **d.** Extracción sólida-líquida con MeOH.

5.5. Pruebas biológicas de los extractos crudos de *A. chevalieri*.

Se realizaron pruebas de actividad biológica de los extractos crudos obtenidos en el punto 5.2. Estas pruebas consistieron en evaluar la actividad inhibitoria del crecimiento de la bacteria patógena para pollos *S. enterica* serovar Pullorum ATCC 13036. Mediante la técnica de Bioautografía se logró observar la presencia de los halos de inhibición de crecimiento y mediante la técnica de microdilución en caldo se logró obtener la concentración que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano (IC_{50}) y la mínima concentración que inhibe el total crecimiento bacteriano (MIC).

5.5.1. Bioautografía por punto de los extractos crudos

A partir de la prueba de bioautografía de superposición de agar por punto (Figura S1), se observó que el extracto crudo EtOAc exhibió el mayor halo de inhibición, con un diámetro promedio de 6.8 ± 0.3 mm, seguido del DCM con un diámetro promedio de 4.9 ± 0.5 . Sin embargo, se observó que el extracto MeOH no presentó actividad inhibitoria. En comparación, el control positivo tetraciclina presentó un diámetro promedio de 15.5 ± 0.5 mm (Figura 3).

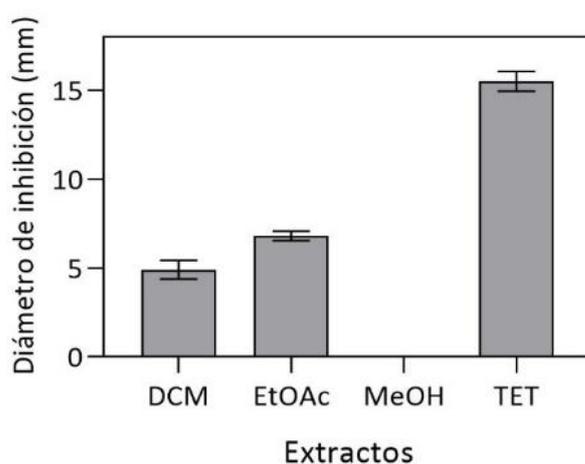


Figura 3. Bioautografía de los extractos crudos de *Aspergillus chevalieri*. DCM (extracto de diclorometano); EtOAc (extracto de acetato de etilo); MeOH (Extracto metanólico) y TET (tetraciclina).

5.5.2. Microdilución en caldo de los extractos crudos

Mediante la microdilución en caldo, se determinaron la MIC y la IC₅₀ para cada extracto. El extracto crudo de diclorometano (DCM) presentó una MIC de 8 mg/mL y una IC₅₀ de 7.0 mg/mL (CI 95% [5.0, 7.9] mg/mL), mientras que, el extracto crudo de acetato de etilo (EtOAc) presentó una MIC de 4 mg/mL y una IC₅₀ de 3.0 mg/mL (CI 95% [2.3, 3.5] mg/mL). Estos resultados sugieren que el extracto EtOAc posee una mayor actividad antibacteriana contra *S. enterica* serovar Pullorum en comparación con el extracto DCM. Además, se observó que el control positivo tetraciclina presentó una MIC de 0.5 µg/mL y una IC₅₀ 0.097 µg/mL (CI 95%: [0.078, 0.119] µg/mL) destacando su potente actividad antibacteriana.

La Figura 4 muestra las curvas dosis-respuesta de cada extracto, empleadas para el cálculo del IC₅₀ mediante una regresión logística de 4 parámetros (4PL), lo que permite visualizar de manera gráfica la actividad de los extractos crudos de *A.*

chevalieri. frente a la bacteria *S. enterica* serovar Pullorum, junto con los valores de IC_{50} obtenidos.

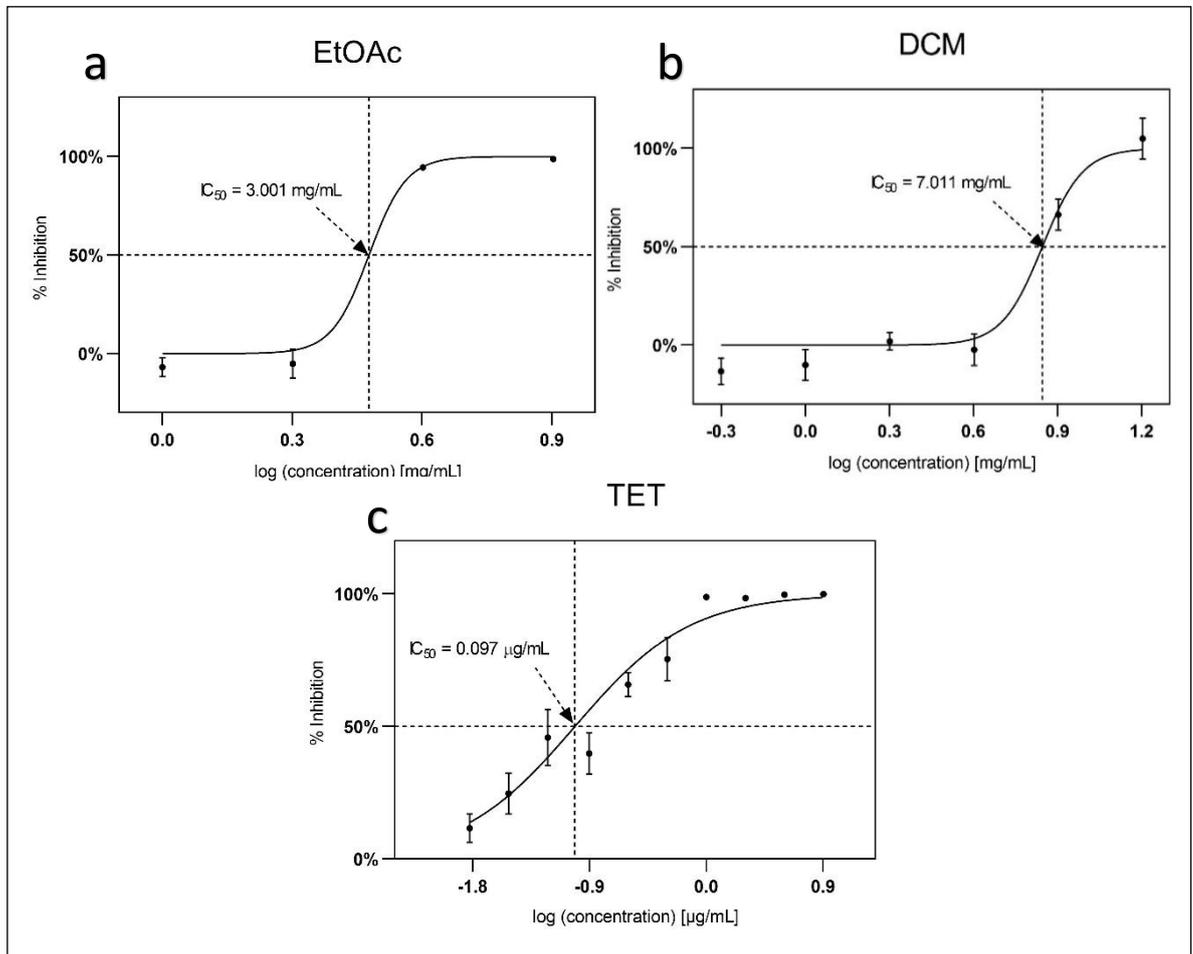


Figura 4. Curvas dosis-respuesta (4PL) de los extractos crudos de *Aspergillus chevalieri*.

IC_{50} del del extracto crudo de EtOAc (a); DCM(b); Tetraciclina (c)

5.6. Fraccionamiento del extracto crudo de acetato de etilo (EtOAc)

Luego de las pruebas biológicas de actividad antimicrobiana se procedió con el fraccionamiento del extracto crudo EtOAc con el objetivo de concentrar los componentes bioactivos. El fraccionamiento se llevó a cabo utilizando 1853 mg del extracto EtOAc, mediante cromatografía líquida en columna, lo cual resultó en la

obtención de 14 fracciones (Figura S2). Las fracciones más abundantes que presentaron masas iguales o mayores a 150 mg, fueron identificadas como las fracciones 6, 9, 10 y 13 (Tabla 2).

Tabla 2

Masas totales de las fracciones obtenidas a partir del extracto acetato de etilo (EtOAc)

Fracción	Masa (mg)
1	34.6
2	4.9
3	15.3
4	7.2
5	5.0
6	177.5
7	61.7
8	48.9
9	316.3
10	149.4
11	55.1
12	133.5
13	504.4
14	60.4

5.7. Bioautografía por punto de las fracciones del extracto crudo de acetato de etilo de *A. chevalieri*.

A partir de las fracciones obtenidas del proceso anterior, se procedió a evaluar su actividad antimicrobiana contra *S. enterica* serovar Pullorum mediante la técnica de bioautografía (Figura S3). Los resultados mostraron que, de un total de 14 fracciones evaluadas, se encontró que 11 fracciones tuvieron actividad

antimicrobiana (Figura 5). Además, se puede observar que la fracción F4 presentó mayor actividad de manera significativa ($p < 0.05$), con un halo de inhibición de 14.8 ± 0.6 mm de diámetro. Por otro lado, las fracciones F6, F9 y F10, que presentaron las mayores masas descritas en la Tabla 2, presentaron una actividad antimicrobiana moderada, con diámetros de halo de inhibición promedio de 5.3 ± 0.5 , 6.2 ± 0.6 y 6.7 ± 0.8 mm respectivamente (Tabla S5).

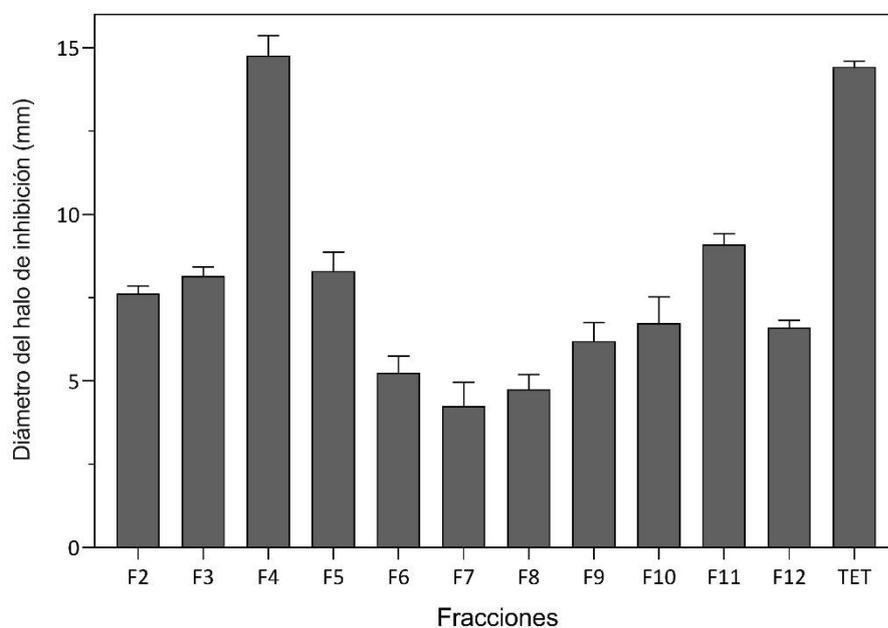


Figura 5. Diámetros de los halos de inhibición de las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo EtOAc. Droga de referencia: Tetraciclina (TET)

5.8. Sub-fraccionamiento de las fracciones activas del extracto crudo de acetato de etilo de *A. chevalieri*. mediante el sistema puriFlash 520 xs Plus.

Considerando tanto la masa de las fracciones obtenidas como su actividad antimicrobiana, se decidió continuar con el proceso de sub-fraccionamiento de las fracciones F6, F9 y F10. Estas tres fracciones destacaron por tener la mayor masa, como se indica en la Tabla 3 y presentaron una actividad antimicrobiana moderada, como se observa en la Figura 5. El proceso de sub-fraccionamiento se llevó a cabo utilizando el equipo puriFlash 520 xs Plus ubicado en el Laboratorio PHARMADEV UMR 152 – IRD en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Toulouse 3 Paul Sabatier en Francia, bajo la dirección del Dr. Mohamed Haddad. Este proceso, facilitado por el programa de pasantía internacional de 1 mes financiado por ProCiencia-CONCYTEC, permitió obtener 11 sub-fracciones de la fracción F6, 15 sub-fracciones de la fracción F9 y 9 sub-fracciones de la fracción F10 (Tabla 3).

Tabla 3*Masas totales (en mg) de las sub-fracciones obtenidas de las fracciones 6, 9 y 10*

Sub-fracción	Masa	Sub-fracción	Masa	Sub-fracción	Masa
6.1	11.5	9.1	4.1	10.1	4.3
6.2	9.3	9.2	23.3	10.2	13.1
6.3	8.0	9.3	21.8	10.3	19.2
6.4	30.9	9.4	18.7	10.4	9.8
6.5	95.4	9.5	31.9	10.5	17.6
6.6	4.0	9.6	52.7	10.6	16.4
6.7	7.0	9.7	25.2	10.7	46.5
6.8	9.0	9.8	51.9	10.8	2.1
6.9	2.9	9.9	22.1	10.9	13.2
6.1	4.3	9.1	15.4		
6.11	5.9	9.11	8.5		
		9.12	11.0		
		9.13	8.9		
		9.14	8.2		
		9.15	11.9		

5.9. Bioautografía por punto de las sub-fracciones del extracto crudo de acetato de etilo de *A. chevalieri*.

Luego de obtener las sub-fracciones descritas en la Tabla 3, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *S. enterica* serovar Pullorum mediante la técnica de bioautografía (Figura S4). Este análisis reveló que seis sub-fracciones, específicamente F6.4, F9.2, F9.3, F9.4, F10.2 y F10.3 presentaron actividad antimicrobiana (Figura 6) con diámetros de halos de inhibición promedio de 6.2 ± 0.2 , 8.2 ± 0.2 , 9.1 ± 0.2 , 8.6 ± 0.6 , 6.8 ± 0.4 y 5.7 ± 0.2 mm respectivamente (Tabla S6).

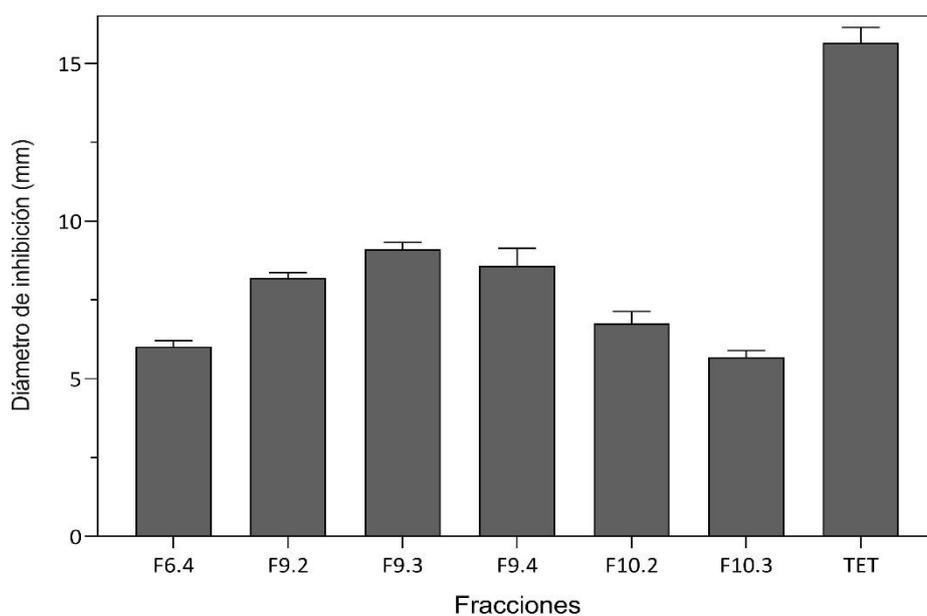


Figura 6. Diámetros de halo de inhibición de sub-fracciones obtenidas de las fracciones F6, F9 y F10. Droga de referencia: Tetraciclina (TET)

5.10. Análisis UHPLC/MS

Se eligieron la fracción F4 y las sub-fracciones F9.2, F9.3, F9.4 y F10.2 para su análisis mediante UHPLC/MS, debido a su mayor actividad antibacteriana significativa ($p < 0.05$) en base al diámetro del halo de inhibición en la prueba de bioautografía como se muestra en la Figura 6. Después del procesamiento de los datos espectroscópicos utilizando el software MZmine3 y la base de datos de moléculas del servidor GNPS, y posterior comparación con la información reportada en la literatura, se logró identificar preliminarmente doce compuestos (Tabla 4) presentes en las subfracciones F9.2, F9.3, F9.4 y F10.2. Con respecto a la fracción 4; se obtuvieron datos espectroscópicos que al compararlos con las bases de datos del GNPS (Mass Bank, MoNA, NIST, entre otras), no se encontraron coincidencias con compuestos conocidos.

La tabla incluye el nombre del compuesto, su tiempo de retención (RT), la masa nominal (m/z) y el aducto identificado, así como la subfracción a la que pertenece y las referencias bibliográficas asociadas a cada compuesto. Además, se muestran las estructuras de los compuestos tentativos en la Figura 7. Adicionalmente, se elaboraron las redes moleculares de los compuestos con la data del GNPS y el software Cytoscape versión 3.10.2 (Figura 8) y se elaboraron las redes moleculares de los compuestos presentes en las subfracciones F9.2-4 y F10.2 usando los datos obtenidos del análisis UHPLC/MS, la data del GNPS y el software Cytoscape versión 3.10.2 (Figura 8). Estas redes muestran las interconexiones y relaciones estructurales entre los compuestos.

Cada círculo (nodo) en la red molecular representa un compuesto químico, los cuales están divididos en secciones de diferente color, cuyos tamaños indican la cantidad relativa presente en cada sub-fracción.

Las redes moleculares obtenidas muestran a once de los compuestos que pudieron ser identificados distribuidos en agrupaciones o redes diferentes y a un compuesto en solitario sin formar conexión alguna (lumicromo). Se puede observar

que la red que presenta mayor cantidad de nodos interconectados es el grupo donde se encuentra el derivado de benzofurano, seguido del grupo donde se encuentran el éster de forbol y austinoneol, mientras que el grupo formado por los ftalatos y el grupo de la diaportina son los más pequeños con dos nodos cada uno.

Por otro lado, se puede observar que todos los compuestos que conforman el grupo donde se encuentra el dipeptido pertenecen a la subfracción F9.4 (verde), mientras que los demás grupos contienen compuestos que se encuentran en por lo menos tres subfracciones diferentes como son el caso del grupo las echinulinas y el grupo de la tiramina.

Tabla 4

Lista de doce compuestos preliminarmente identificados en las sub-fracciones F9.2, F9.3, F9.4 y F10.2

N°	Nombre	RT	m/z	Adduct	Fracción	Fórmula	Ref.
1	Maculosin, cyclo(L-Tyr-L-Pro)	5.90	261.12	M+H	9.4	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	(Ahmed et al., 2017; Sun et al., 2024; X. Yu et al., 2021)
2	N-Acetyl-tyramine	7.14	180.10	M+H	9.4	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	(T. Gao et al., 2017; Zhao et al., 2010)
3	1-[3-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2-propanyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]ethanone	8.93	237.11	M+H	10.2	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	(H. L. Li et al., 2019)
4	Isopentenyladenine	9.11	204.12	M+H	9.4	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	(Gubiani et al., 2017)
5	Lumichrome	11.59	243.09	M+H	9.4	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂	(T. Gao et al., 2017; Shi et al., 2015)
6	Diaportina	13.76	251.09	M+H	9.4	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	(Harris & Mantle, 2001; R.-Z. Wang et al., 2023; Y. Wu et al., 2019)
7	Neoechinulin A	14.68	324.13	[M+H] ⁺	9.2; 9.4	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	(Alhadrami et al., 2022; Arai et al., 1989; Liang et al., 2018; Marchelli et al., 1977; Sharifi-Rad et al., 2021; Youssef & Singab, 2021)
8	4-deoxyphorbol-13-acetate	17.66	432.24	M ⁺ ACN ⁺ _H	9.3	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	(Adolf & Hecker, 1977)
9	Austinoneol	17.66	415.21	M+H	9.3	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	(Wen et al., 2020)
10	Echinulin	20.99	462.31	M+H	9.4	C ₂₉ H ₃₉ N ₃ O ₂	(Arai et al., 1989; Liang et al., 2018; Youssef & Singab, 2021)
11	Dibutyl phthalate	21.03	279.16	M+H	9.4; 9.2; 9.3	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	(Tian et al., 2016)
12	Di(2-ethylhexyl)phthalate	21.40	391.28	M+H	9.2; 9.3	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	(Abdel-Wahhab et al., 2020; Lotfy et al., 2018)

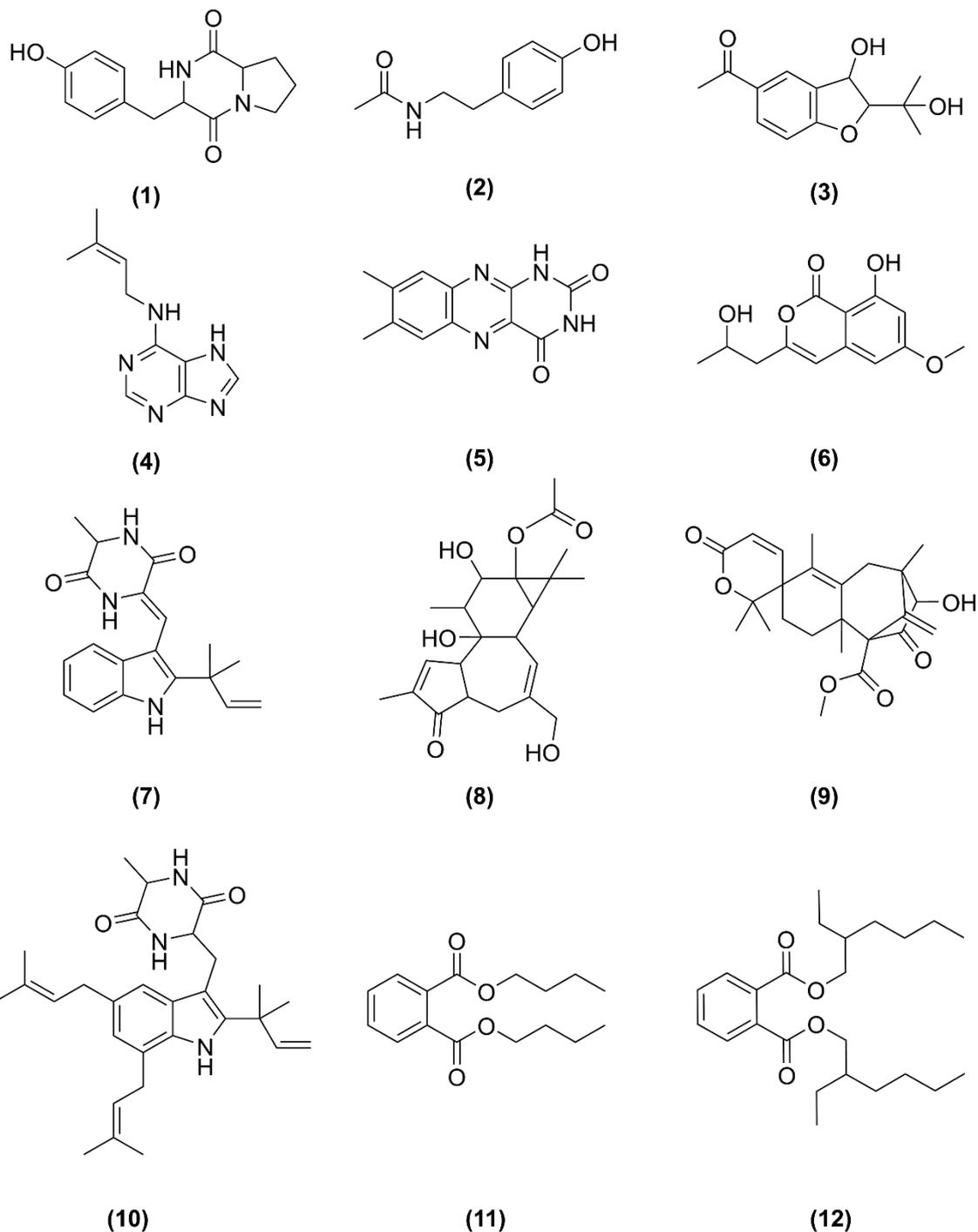


Figura 7. Estructuras de los compuestos preliminarmente identificados en las sub-fracciones F9.2, F9.3, F9.4 y F10.2. Cyclo (L-Tyr-L-Pro) (1), N-Acetyl-tyramine (2), 1-[3-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2-propanyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]ethanone (3), Isopentenyladenine (4), Lumichrome (5), Diaportina (6), Noechinulin A (7), 4-deoxyphorbol-13-acetate (8), Austinoneol (9), Echinulin (10), Dibutyl phthalate (11) y Di(2-ethylhexyl) phthalate (12).

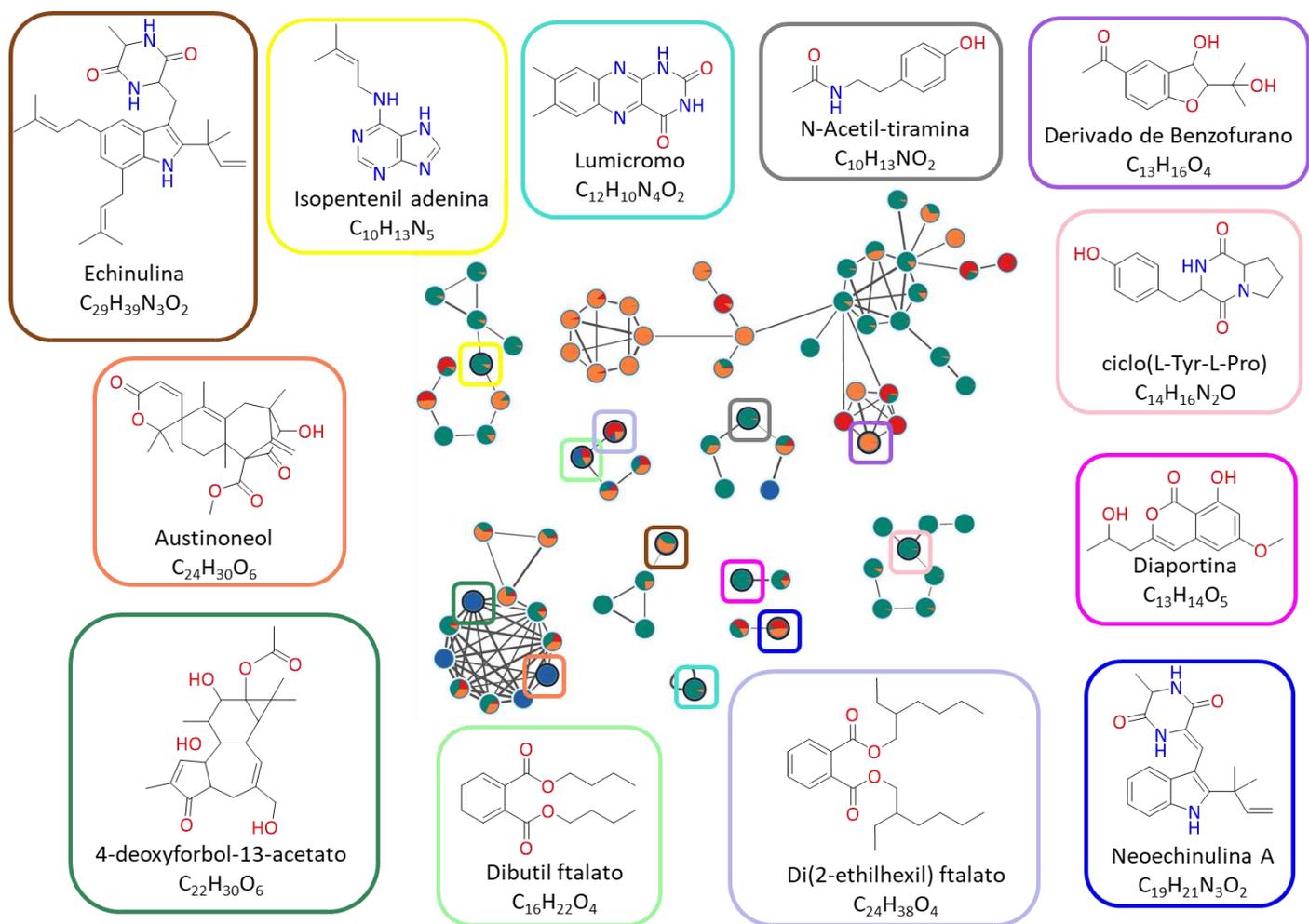


Figura 8. Redes moleculares de las sub-fracciones 9.2, 9.3, 9.4, y 10.2 y las estructuras de los compuestos identificados tentativamente. Leyenda de color: 9.2 (rojo), 9.3 (azul), 9.4 (verde) y 10.2 (naranja). Los compuestos que coinciden con la base de datos del GNPS están resaltados con un recuadro del mismo color que su estructura tentativa.

VI. DISCUSIÓN

Las fuentes donde el hongo *A. chevalieri* ha sido aislado previamente son diversas, por ejemplo, este hongo filamentoso fue hallado en relación simbiótica asociado a la esponja marina, *Grantia compressa* (Bovio, Garzoli, et al., 2019), y también, a una especie arbórea de manglar, *Rhizophora mucronate* (Hafez Ghoran et al., 2023). Por otro lado, esta especie también habita los suelos y puede subsistir en ambientes húmedos y de poca luz. En particular, *A. chevalieri* fue aislado a partir del sedimento marino en el mar del sur de China (Yan et al., 2023), y también es comúnmente encontrado en ambientes interiores (Chen et al., 2017; Sánchez Espinosa et al., 2021), ya que los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* pueden crecer en todo tipo de materia orgánica, como suelos, y a condiciones de poca humedad, por lo que se utiliza como biomarcador para detectar daños por humedad en hogares (Chen et al., 2017). Además, esta especie se encuentra en el meju, una comida tradicional coreana preparada a partir de soya seca fermentada, y, por último, es encontrado frecuentemente en alimentos para animales de granja (Chen et al., 2017). Este trabajo es el primer reporte de una asociación simbiótica entre *A. chevalieri* y *H. illucens*.

La identificación de la cepa HGU11_3 mediante la región ITS1, 5.8s e ITS2, no proporcionó resultados definitivos suficientes para identificar este hongo a nivel de especie, ya que este marcador molecular no contiene suficiente variabilidad para distinguir entre las especies de la sección *Aspergillus*. Por esta razón, se emplearon primers correspondientes a los genes que codifican las proteínas β -tubulina (gen *benA*) y Calmodulina (gen *CaM*), logrando identificar la cepa HGU11_3 como *A. chevalieri*. Estos marcadores basados en secuencias codificantes se utilizan

ampliamente para lograr una mayor resolución en la diferenciación e identificación de especies dentro del género *Aspergillus*. La sección *Aspergillus* se divide en tres clados: Clado *A. ruber*, clado *A. glaucus* y clado *A. chevalieri*, éste último incluye a las especies *A. chevalieri*, *A. costiformis*, *A. cristatus*, *A. intermedius*, *A. montevidensis* (= *A. amstelodami*) y dos nuevas especies *A. caperatus* y *A. porosus*. Es por esta cercanía filogenética que los porcentajes de identidad fueron altos y muy similares entre estas especies al emplear el marcador ITS, como se puede observar en la Tabla S3 (Abreu et al., 2021; Alshehri & Palanisamy, 2020; Chen et al., 2017).

Con respecto a los extrolitos (metabolitos secundarios producidos por hongos que son liberados o excretados fuera de la célula fúngica hacia el entorno circundante), las especies de *A. chevalieri* producen moléculas pertenecientes a la familia de las dicetopiperacinas indólicas, como las neoechinulinas y echinulinas. En concreto, en este trabajo se ha identificado tentativamente la presencia de Echinulina (10) y de Neoechinulina A (7). Así mismo, es posible encontrar moléculas pertenecientes a otras familias químicas, como las Asperflavinas, auroglaucinas, bisantronas, dihidroauroglaucinas, emodinas, epiheveadrinas, flavoglaucina, isoequinulinas, fiscionas, questinas, questinoles y tetrahidroauroglaucinas (Bovio, Garzoli, et al., 2019; Chen et al., 2017; Yan et al., 2023)

Los extractos de *A. chevalieri*. han mostrado una gama interesante de actividad antimicrobiana, especialmente el extracto de acetato de etilo (EtOAc), que presentó una notable inhibición del crecimiento de *S. enterica* serovar Pullorum, un patógeno importante en la industria avícola. Este hallazgo está alineado con estudios previos

que demuestran la capacidad de los metabolitos secundarios de hongos para inhibir bacterias patógenas (Baranova et al., 2021; Correa et al., 2019; Makky et al., 2021). Sin embargo, hay pocos reportes donde se estudie el papel endosimbionte de los mohos en insectos, que en su mayoría son considerados como entomopatógenos; no obstante, estos hongos podrían ser ingeridos junto con los alimentos y adaptados por *H. illuscens*, estableciendo una relación simbiótica. El microorganismo le provee al insecto enzimas útiles o sustancias antimicrobianas, y el insecto le provee al microorganismo un entorno rico en nutrientes para su crecimiento. Algunos de estos hongos incluso pueden sobrevivir en cavidades glandulares o invaginaciones cuticulares llamadas micangias, donde pueden reproducirse y ser transportados a nuevos hospedadores por los insectos, lo que indica una relación simbiótica potencialmente beneficiosa (Correa, 2018; Correa et al., 2019; Fu et al., 2020; You et al., 2015).

Con respecto a las pruebas de bioautografía, realizadas por la técnica “por punto”, revelaron que el extracto crudo de EtOAc exhibió los mayores halos de inhibición comparado con otros extractos, como el de diclorometano (DCM), destacando su potencial como fuente de agentes antibacterianos (Al-Fakih & Almaqtri, 2019). Aunque los halos de inhibición fueron menores en comparación con el control de tetraciclina, es relevante considerar que los extractos naturales como los de *A. chevalieri* suelen contener una mezcla de compuestos, cuya actividad sinérgica podría ser la responsable de los efectos observados y no la potencia de un único agente, como es el caso de la tetraciclina pura (Cary et al., 2018; May Zin et al., 2017).

Al fraccionar el extracto de EtOAc y realizar la bioautografía por punto, se lograron comparar los tamaños del diámetro de los halos de inhibición, y se identificó varias fracciones con actividades antimicrobianas variables. Es notable que, aunque las fracción F4, la relación entre la masa y la actividad no fue directamente proporcional, sugiriendo que pequeñas cantidades de compuestos altamente activos podrían estar presentes en algunas fracciones. Este fenómeno ha sido observado en otros estudios donde la actividad biológica es atribuida a compuestos presentes en concentraciones menores (T. Gao et al., 2017).

Se eligió la técnica de bioautografía por superposición de agar, con la variante “por punto”, puesto que una de sus ventajas es la mejor difusión de los componentes al agar, facilitando la interacción con *S. enterica* serovar Pullorum (Balouiri et al., 2015; Choma & Jesionek, 2015). Además, al analizar los diámetros del halo de inhibición, se logró comparar la actividad entre las fracciones y así, discernir que fracción ameritó el reprocesamiento por cromatografía semi – preparativa, en base al mayor halo y por ende mayor grado de actividad (Marston, 2011). Las ventajas y desventajas de la técnica por punto y con placa TLC desarrollada se exponen en la tabla S7, en la sección de anexos.

A pesar de que la fracción 4 mostró una actividad superior, basada en el mayor diámetro del halo de inhibición obtenido por la bioautografía por punto, su masa obtenida fue pequeña y limitó los métodos analíticos aplicados. Es por esta razón que se requerirán experimentos adicionales para determinar su composición. El primer paso será la producción de más extracto crudo, lo que permitirá aislar esta fracción y obtener material suficiente para su caracterización. Aunque el análisis por UHPLC/HRMS ayudó en la identificación de otras moléculas de las otras

fracciones, la falta de coincidencias en las bases de datos del GNPS (NIST, MoNA, Mass Bank, etc) de la fracción, puede sugerir la presencia de compuestos nuevos. Por ello, la producción de cantidades mayores, seguido del aislamiento biodirigido, permitirá la aplicación de la resonancia magnética nuclear, uno de los métodos más empleados para la elucidación de estructuras. (Wolfender et al., 2019). Además, al complementar la RMN junto con la espectrometría de masas, ofrecerá un enfoque integrado para la identificación estructural cuando el análisis por LC/MS no es suficiente (Emwas et al., 2019)

El sub-fraccionamiento y el análisis posterior mediante UHPLC/MS de las fracciones más activas, permitió la identificación preliminar de doce compuestos que podrían estar contribuyendo a la actividad antibacteriana observada contra *S. enterica* serovar Pullorum. La identificación de estos compuestos genera la oportunidad de estudios futuros de su potencial como antibióticos o como estructuras base para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Algunos de estos compuestos han sido reportados en la literatura como antimicrobianos, lo cual confirma parcialmente estos hallazgos.

En el caso de la Maculosina, (Cyclo(L-Tyr-L-Pro)) (**1**), es un compuesto clasificado como dicetopiperazina, que está presente en diversas especies de hongos, como por ejemplo, algunas cepas de *Aspergillus sp.* SY2601(Sun et al., 2024), *A. versicolor* (Ahmed et al., 2017), y también en *Streptomyces sp.* KTM18 (Paudel et al., 2021). Aunque no se ha comprobado si este compuesto presenta actividad antibacteriana contra *S. enterica* serovar Pullorum, se ha demostrado en estudios previos su potencial antiviral contra el virus de la hepatitis C al inhibir el sitio activo de la proteasa NS3, el cual es un elemento clave para el procesamiento

de proteínas en la replicación viral, con un IC₅₀ de 8.2 µg/mL. Además, se ha observado una selectividad mayor como inhibidor de la proteasa del VHC en comparación con la tripsina humana, la cual presenta un valor de IC₅₀ de 37.9 µg/mL. (Ahmed et al., 2017). También se ha reportado que este compuesto presenta actividad antioxidante, como se evaluó mediante el ensayo con el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Paudel et al., 2021). En este estudio, la Maculosina logró neutralizar en un 50% el poder oxidante del DPPH a una concentración de 2.16 µg/mL, lo que sugiere posibles beneficios terapéuticos adicionales. En el mismo estudio, se determinó que la Maculosina no es tóxica a la concentración máxima de 128 mg/mL, acorde con el bioensayo de letalidad en artemias (Paudel et al., 2021). A pesar de que en la literatura no se ha reportado actividad contra *S. enterica* serovar Pullorum, su potencial como agente antiviral y antioxidante sugiere que podría tener propiedades bioactivas adicionales que podrían ser exploradas en futuras investigaciones.

La presencia de N-Acetyl-tyramine (**2**), encontrado en este estudio, se ha reportado anteriormente en *Aspergillus*, lo que confirma la validez de nuestros datos y sugiere una posible fuente natural para este compuesto (T. Gao et al., 2017; Zhao et al., 2010). Además, se ha demostrado que este compuesto posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas, como contra *Vibrio anguillarum* (T. Gao et al., 2017), lo que podría ser importante su potencial aplicación en el control de enfermedades infecciosas o el desarrollo de agentes antimicrobianos. En la misma línea de las propiedades antibacterianas, se ha reportado que el compuesto N-Acetyl-tyramine inhibe el quorum sensing, un proceso vital para la comunicación y regulación génica en bacterias, en *Pseudomonas aeruginosa* (Reina

et al., 2019). Esto podría ser útil para combatir la virulencia bacteriana propia de *S. enterica* serovar Pullorum y desarrollar terapias contra la resistencia antibiótica.

EL compuesto **(3)** 1-[3-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2-propanyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]ethanone, encontrado en la fracción activa 10.2, es un derivado del benzofurano. Este presenta un motivo estructural que se encuentra en varios medicamentos y posee diversas propiedades biológicas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, anticancerígenas, antifúngicas, antimaláricas y antibacterianas (Grabovyi et al., 2020). Los derivados del benzofurano generalmente se encuentran en *Aspergillus terreus* (Amr et al., 2023). Aunque este compuesto (3) no está reportado, se ha encontrado una relación con otros compuestos, como con la Asperterreusina C (Z. Wu et al., 2018), que implica la eliminación OH del carbono 7 y sustituyendo la etanona por un grupo **formilo** en el carbono 3. Se demostró que la Asperterreusina C tiene actividad antibacteriana contra *Edwardsiella tarda* (bacteria gramnegativa) con una MIC de 64 µg/mL; contra *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, 32 µg/mL. Del mismo modo, guarda relación con el ácido Anodendroico, eliminando un grupo OH del carbono 7 y sustituyendo la etanona por un grupo **carboxilo** en el carbono 3. El ácido

Anodendroico presentó actividad antimicrobiana contra *Edwardsiella tarda* con una MIC de 32 µg/mL, y contra *Staphylococcus aureus*, con una MIC de 64 µg/mL (H. L. Li et al., 2019).

La Isopenteniladenina (**4**), ubicada dentro de la fracción activa 9.4, se ha reportado como un derivado en *A. versicolor* como 2-hydroxy-6-N-isopentenyladenina (Gubiani et al., 2017), cuya diferencia es un grupo hidroxilo en el carbono 2 del compuesto (**4**). No se ha reportado evidencia de actividad antibacteriana o alguna otra bioactividad, sin embargo, su detección en una fracción activa sugiere un posible papel en la inhibición de *S. enterica* serovar Pullorum, lo que podría explorarse en futuros estudios sobre su actividad antimicrobiana.

El Lumicromo (**5**), presente en este estudio, es también un metabolito secundario reportado en las especies *Aspergillus sydowii* (T. Gao et al., 2017) y *A. fumigatus* (Shi et al., 2015). Esta flavina presentó una actividad antibacteriana moderada contra *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus* y *Vibrio anguillarum*,

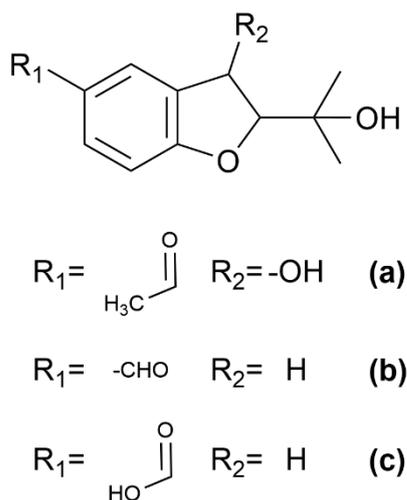


Figura 9. Estructura central de los derivados del benzofurano. (a). Compuesto 3; (b). Asperterreusina; (c). ácido Anodendroico

con un valor de MIC de 25.0 μ M, 6.30 μ M y 25.0 μ M respectivamente. Aunque se ha observado una actividad antibacteriana moderada para el Lumicromo, su contribución a la actividad general del extracto podría ser significativa. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender completamente su mecanismo de acción y su potencial terapéutico.

Se determinó la presencia de la Diaportina (**6**), la cual fue reportada en *Aspergillus flavus* CPCC 400810 (R.-Z. Wang et al., 2023), en *Aspergillus ochraceus* (Harris & Mantle, 2001) y en *A. oryzae* (Nakazawa et al., 2012). La Diaportina proviene del clúster génico de la policétido sintasa (PKS) involucrado en la biosíntesis del andamiaje de esta molécula (Almeida et al., 2018). Este compuesto exhibió actividad antimicrobiana contra varios patógenos como *E. coli*, *Micrococcus luteus*, MRSA y *S. aureus* con zonas de inhibición de 1.73, 2.47, 9.50 y 9.0 mm respectivamente, a una concentración de 100 μ g/disco (de Medeiros et al., 2018; Deshmukh et al., 2022). Por lo tanto, la Diaportina ha demostrado una amplia actividad antimicrobiana contra una variedad de patógenos comunes (Gram-positivos y Gram-negativos), lo que la convierte en un candidato prometedor para el desarrollo de terapias antimicrobianas. Su presencia en el extracto activo sugiere que podría contribuir significativamente a la actividad observada contra *S. enterica* serovar Pullorum.

La Neoechinulina A (**7**), compuesto de la familia de las dicetopiperazinas indólicas, se reportó como presente las fracciones 9.2 y 9.3, las cuales resultaron como bioactivas en este trabajo. Este compuesto contiene una base indólica unida a un anillo de dicetopiperazina (Ma et al., 2016). Ha sido reportado en *Aspergillus amstelodami* (Marchelli et al., 1977; Wiese et al., 2011), *A. chevalieri* (Bovio,

Garzoli, et al., 2019; Yan et al., 2023), *A. ruber* (Liang et al., 2018). Con respecto a su actividad antibacteriana, se tiene reportes de uno de sus análogos, la Neoechinulina B, aislado de *A. chevalieri*, el cual mostró actividad antibacteriana contra dos bacterias gramnegativas patógenas: *Aeromonas hydrophila* (MIC: 4 µg/mL) y *E. coli* (MIC: 8 µg/mL) (Yan et al., 2023). Por su parte, la neoechinulina A, en el trabajo de Bovio et al (2019), no presentó ninguna actividad antibacteriana contra patógenos de referencia (*S. aureus*, *E. fecalis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*; MIC >128 µg/mL) (Bovio, Garzoli, et al., 2019). De manera similar, en el trabajo de Liang et al., el compuesto (7) presentó una débil actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Salmonella Typhimurium* con una IC₅₀ de 50 µM para todas las especies (Liang et al., 2018). Sin embargo, en diversas investigaciones, se ha encontrado diversas aplicaciones terapéuticas, incluyendo propiedades antivirales, anticancerígenas, entre otras (Alhadrami et al., 2022; Mitra et al., 2022; Sharifi-Rad et al., 2021). En el estudio de Bovio et al (2019), se determinó que la Neoechinulina A mostró una actividad antiviral prometedora contra los virus de la Influenza A (IAV) y Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Después de realizar las pruebas biológicas en células MDCK y células VERO, se evidenció la inhibición de la replicación del IAV en un 70%. Además, fue la primera vez que se observó una inhibición de la replicación viral de HSV-1 por parte de la Neoechinulina A (Bovio, Garzoli, et al., 2019). Luego, en el estudio de Alhadrami et al (2022), se investigó sobre el potencial de la Neoechinulina A para inhibir la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2, enzima crucial para la replicación viral y como blanco para nuevas aplicaciones farmacológicas. Este compuesto (7) demostró

tener un efecto inhibitorio significativo en la M^{pro}, con un valor de IC₅₀ de 0.47 μ M, mostrando una actividad prometedora. Por otro lado, la Neoechinulina A presentó propiedades anticancerígenas contra el cáncer cervical, al provocar la apoptosis mediadas por caspasas, y al aumentar la producción de citocromo c mediado por mitocondrias y BAX-2 (Wijesekara et al., 2013).

El compuesto **(8)**, anotado como 7b,9-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1,1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9-decahydro-9aH-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulen-9a-yl acetate, fue identificado como **4-deoxyphorbol-13-acetate**, un diterpeno tetracíclico de tipo tigliano (Adolf & Hecker, 1977). Este compuesto fue reportado en la corteza del árbol de la *planta Xylopia emarginata* en el trabajo de Pares et al (2021). Se demostró su eficacia como insecticida de las fracciones solubles en DCM a partir de extractos metanólicos, los cuales resultaron tóxicos contra ácaros de la especie *Dermanyssus gallinae*, conocido comúnmente como ácaro rojo, es el ectoparásito hematófago más importante de las gallinas ponedoras comerciales (Pares et al., 2021). Este estudio indica que además de investigar el potencial antibacteriano de *Aspergillus* procedentes de *H. illucens* contra patógenos bacterianos, se puede considerar su capacidad para controlar los ectoparásitos que afectan a las gallinas. Esto abre las posibilidades para desarrollar estrategias de protección avícola. Por otro lado, este es el primer hallazgo que un compuesto derivado del phorbol se reporta en *A. chevalieri*. Por lo general, los derivados del phorbol son reportados en especies del género *Euphorbia* (Adolf & Hecker, 1977; De la Torre-Tarazona et al., 2020; Kinghorn, 1979) y *Jatropha* (da Silva et al., 2019). Este compuesto es conocido por su actividad inhibitoria del VIH al actuar de manera sinérgica con antirretrovirales

(De la Torre-Tarazona et al., 2020). Asimismo, los derivados de phorbol que se conocen comúnmente por su actividad de promoción tumoral. Estos compuestos imitan la acción del diacilglicerol (DAG), activador de la proteína quinasa C, lo que regula diferentes vías de transducción de señal y otras actividades metabólicas celulares. Estos compuestos tienen actividades biológicas altamente específicas de acuerdo con su estructura química. Aunque ocurren naturalmente en muchas plantas de las familias Euphorbiaceae y Thymelaeaceae, estos compuestos son tóxicos para animales, incluso a concentraciones pequeñas, lo que limita su uso en alimentos y subproductos agrícolas para animales (Goel et al., 2007) .

El Austinoneol **(9)** es un meroterpeno que ha sido identificado en *Aspergillus sp.* ZYH026 (Wen et al., 2020), *A. nidulans* (Lo et al., 2012), y se ha informado también de su presencia en otras especies de *Penicillium*, como *P. brasilianum* (Bazioli et al., 2017). Hasta la fecha, no se ha observado actividad biológica asociada al compuesto, sin embargo, se ha detectado en la subfracción activa 9.3, por lo que podría sugerir cierto grado de actividad antibacteriana contra *S. enterica* serovar Pullorum, aunque aún no se ha confirmado.

La Echinulina **(10)**, un alcaloide de la familia de las dicetopiperacinas indólicas, fue reportado en las especies *A. ruber* (Liang et al., 2018; Youssef & Singab, 2021), *A. amstelodami* (Elsbaey et al., 2019; Wiese et al., 2011), *A. chevalieri* (Bovio, Garzoli, et al., 2019) y *Aspergillus fumigatus* MR2012 (Alhadrami et al., 2022). Hay pocas referencias que examinen la actividad antibacteriana este compuesto, que por lo general se reporta que este compuesto resulta inactivo contra las bacterias terrestres (Bovio, Fauchon, et al., 2019). En un estudio donde utilizando la técnica de difusión de disco, se observó una actividad

débil contra *Staphylococcus aureus*, con un diámetro de inhibición de 8 mm generado por un disco conteniendo 100 µg/mL de este compuesto y con un MIC de 256 µg/mL (Du et al., 2012, 2017). En contraste con lo expuesto anteriormente, solo se menciona en un estudio que se evidenció una ligera sinergia de la Echinulina al combinarse con el antibiótico cefotaxima (CFX), la cual se manifestó en un aumento del halo de inhibición comparado con el halo generado únicamente por el antibiótico CFX en la cepa *E. coli* ESBL SA/2 (May Zin et al., 2017). Se reportó por primera vez actividad antibacteriana y alguicida en ambientes marinos, específicamente contra la bioincrustación de microorganismos en infraestructuras marinas. La echinulina mostró afectar la adhesión de la bacteria *Roseobacter litoralis* (Low observable effect concentration, LOEC 0.1 µg/mL), y también afectó el crecimiento y la adhesión de *Pseudoalteromonas citrea* (LOEC 0.01 y 0.001 µg/mL, respectivamente) (Bovio, Fauchon, et al., 2019). Por otra parte, este compuesto inhibió la producción de melanina en células de melanoma B16, mostrando un valor de IC₅₀ de 98.0 ± 1.2 µM. Esta prueba resulta prometedora para la investigación de productos que puedan reducir la hiperpigmentación en la piel (Elsbaey et al., 2019). Las dicetopiperacinas indólicas son alcaloides cuya cualidad es que provienen de un dipéptido, específicamente de la condensación de triptófano con algunos aminoácidos como la L-alanina, L-prolina o también L- triptófano, formando el anillo de dicetopiperazina. (Du et al., 2017)

El Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (**11**) se encontró en las fracciones 9.2 y 9.3. Comparando este hallazgo con otro trabajo, esta molécula se identificó por primera vez en *Aspergillus awamori*, hongo asociado al lecho del río Nilo. De la misma manera que en esta investigación, se obtuvo a partir de un extracto crudo de

acetato de etilo. Después de un proceso de purificación y detección por NMR, se logró aislar este compuesto y se evaluó su actividad antimicrobiana por medio de difusión por disco de agar. Se determinó que este compuesto tiene actividad contra la levadura *Candida albicans*, con un halo de inhibición de 20 mm. y una alta actividad contra la bacteria Gram-positiva *Sarcina lutea*, con un diámetro de inhibición de 23 mm. Sin embargo, el DEHP no mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 44330 y *Escherichia coli* ATCC 5087 (Lotfy et al., 2018). Esto sugiere que, al ser *E. coli* una bacteria Gram-negativa, tampoco actuaría como un compuesto activo contra *S. enterica* serovar Pullorum, al ser también Gram-negativa. Estos resultados difieren del trabajo de Rajamanikyam et al. (2017), donde aislaron DEHP de *Brevivacterium mcbrellneri*. A diferencia de Lotfy et al. (2018) donde emplearon difusión en agar, en este trabajo se empleó la microdilución en caldo, presentando en este caso actividad antibacteriana contra gramnegativas como *E. coli*, con una MIC fue de 37,5 µg/mL y contra *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, con una MIC de 75 µg/mL en ambas especies (Rajamanikyam et al., 2017). Esto sugiere que la evaluación de la actividad antibacteriana es más sensible por microdilución que por difusión de disco de agar. Además, es por este contraste de ambos resultados que se necesitarían más procesos de purificación para probar directamente el compuesto contra *S. enterica* serovar Pullorum y así confirmar su capacidad antibacteriana.

En la misma línea, se ha reportado este metabolito secundario en *A. niger*. Aunque no se llegó a purificar el compuesto, realizaron pruebas con el extracto crudo de acetato de etilo evaluando su capacidad antioxidante contra la Aflatoxina B1, un compuesto mutagénico y carcinogénico. Después de exponer a ratas a esta

aflatoxina, se observó un aumento en las sustancias perjudiciales del organismo (p. ej. Aumento del LDL, de enzimas hepáticas, de ácido úrico y urea), sugiriendo daño hepático y renal, así como marcadores carcinogénicos. La administración del extracto fúngico tuvo un efecto protector ante estos efectos, sugiriendo un potencial para la industria farmacéutica y alimentaria (Abdel-Wahhab et al., 2020).

El Dibutyl phthalate (**12**) es conocido como un plastificante sintético, y contaminante ambiental causante de problemas de fertilidad. Sin embargo, se ha confirmado que puede ser biosintetizado por diversos hongos filamentosos, como en *Aspergillus niger* PTN42, donde fue purificado a partir del extracto de acetato de etilo, al igual que en este trabajo, confirmando su posible presencia en *A. chevalieri* HGU11_3. Esta molécula deriva de la vía metabólica del shikimato, a partir de la esterificación del ácido ftálico y alcohol butílico (Tian et al., 2016). Esta molécula también fue aislada en el trabajo de Rajamanikyam et al. (2017) a partir de *B. mcbrellneri*. Se observó la actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*, con valores de MIC de 18,75 µg/mL para ambas especies) así como de bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*, con valores de MIC de 37,5 µg/mL para ambas especies) (Rajamanikyam et al., 2017).

Los ésteres del ácido pftálico son compuestos químicos artificiales usados ampliamente como plastificadores. También son considerados como contaminantes ambientales por su posible rol como disruptor endocrino. Son encontrados en el suelo, agua, atmósfera y sedimentos, pero también ha sido reportada su presencia en fuentes vegetales, bacterias y hongos, lo que lleva a pensar que son

biosintetizados en la naturaleza (L. Huang et al., 2021). Entre ellos, tenemos dos moléculas reportadas en este trabajo: (DEHP) y Dibutyl phthalate.

Este estudio revela la diversidad de compuestos bioactivos presentes en los extractos de *Aspergillus chevalieri* obtenidos de *H. illucens*, destacando su potencial como fuente de agentes antimicrobianos y compuestos con actividad biológica relevante. La identificación de compuestos como la Maculosina, N-Acetyl-tyramine, Diaportina y Neoechinulina A, entre otros, no solo amplía nuestro conocimiento sobre la bioquímica de estos microorganismos, sino que también abre nuevas vías para la investigación y desarrollo de terapias antimicrobianas y productos farmacéuticos. Además, la relación simbiótica entre los hongos y los insectos como *H. illucens* sugiere un ecosistema microbiano complejo y poco explorado, con posibles implicaciones en la salud humana y animal. Estos hallazgos no solo contribuyen al campo de la microbiología y la biotecnología, sino que también podrían tener aplicaciones prácticas en la industria farmacéutica, la agricultura y la salud pública, abriendo la puerta a futuras investigaciones interdisciplinarias y colaborativas en este campo de estudio.

VII. CONCLUSIONES

- El hongo *Aspergillus chevalieri* HGU11_3 mostró actividad antibacteriana contra *S. enterica* serovar Pullorum ATCC 13036, por lo cual fue seleccionado para la obtención de moléculas bioactivas con propiedades antimicrobianas.
- El extracto de acetato de etilo (EtOAc) obtenido a partir del cultivo en masa de *A. chevalieri* presentó la mayor actividad antibacteriana, con una IC50 de 3.0 ± 0.6 mg/mL y una MIC de 4 mg/mL, superando al extracto de diclorometano (DCM) y El extracto de metanol (sin actividad). Estos resultados indican que el solvente utilizado para la extracción influye en la eficacia antimicrobiana del extracto.
- De las fracciones obtenidas del extracto EtOAc, 11 de las 14 fracciones presentaron actividad antibacteriana, y tres de ellas (F6, F9 y F10) mostraron una relación masa/actividad favorable, lo que sugiere su potencial para la purificación y caracterización de moléculas bioactivas. Las sub-fracciones 9.2, 9.3, 9.4 y 10.2 lograron concentrar la actividad antibacteriana.
- El análisis por UPLC-HRMS permitió identificar preliminarmente los compuestos Neoechinulina A, Echinulina, Austinoneol, 4-deoxyphorbol-13-acetato, Dibutil ftalato, dietilhexil ftalato, cyclo(L-Tyr-L-Pro), N-acetiltiramina un derivado de benzofurano, lumicromo, una aminopurina y diaportina. Estos compuestos, podrían estar involucrados en la actividad antibacteriana observada, aunque se requieren estudios adicionales para individualizar las moléculas para confirmar su actividad específica.

VIII. RECOMENDACIONES

- Continuar con la separación y purificación de las fracciones y subfracciones del extracto crudo para aislar o individualizar los compuestos activos, para así poder enviarlo al servicio de NMR y poder elucidar con certeza la estructura de dicha molécula. Esto permitiría confirmar la actividad antibacteriana de estas moléculas contra *S. enterica* serovar Pullorum impulsando su interés farmacológico
- Incrementar la producción de los metabolitos activos para proseguir con el análisis *in vivo*, como la dosis letal media (DL50), estudios de farmacocinética y farmacodinámica, y profundizar en las pruebas antimicrobianas específicas para cada compuesto.
- Realizar un estudio de DNA del genoma de *Aspergillus chevalieri* para determinar que genes están relacionados en la producción de metabolitos secundarios activos contra *S. enterica* serovar Pullorum ATCC 13036.
- Realizar estudios de actividad antioxidante y otras posibles aplicaciones terapéuticas para el campo de la biomedicina, así como pruebas de citotoxicidad antes de considerar su aplicación en humanos y animales, para garantizar su viabilidad y seguridad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahhab, M. A., El-Nekeety, A. A., Hathout, A. S., Salman, A. S., Abdel-Aziem, S. H., Sabry, B. A., Hassan, N. S., Abdel-Aziz, M. S., Aly, S. E., & Jaswir, I. (2020). Bioactive compounds from *Aspergillus niger* extract enhance the antioxidant activity and prevent the genotoxicity in aflatoxin B1-treated rats. *Toxicon*, 181(March), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.103>
- Abreu, A. G. S., Clemente, W. T., Assunção, C. B., Carvalho, J. B. F., de Braga Almeida, R., Acaiah, R., Oliveira, D. C. P., Liu, S. M., de Souza Motta, C. M., & de Azevedo, A. L. C. M. (2021). A new sensitive molecular marker for *Aspergillus*' Calmodulin gene detection in biological samples, used as a supplementary diagnosis for invasive Aspergillosis (IA). *Brazilian Journal of Development*, 7(5), 44478–44488. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n5-054>
- Adolf, W., & Hecker, E. (1977). Diterpenoid Irritants and Cocarcinogens in Euphorbiaceae and Thymelaeaceae: Structural Relationships in View of their Biogenesis. *Israel Journal of Chemistry*, 16(1), 75–83. <https://doi.org/10.1002/ijch.197700015>
- Ahmed, E. F., Rateb, M. E., Abou El-Kassem, L. T., & Hawas, U. W. (2017). Anti-HCV protease of diketopiperazines produced by the Red Sea sponge-associated fungus *Aspergillus versicolor*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 101–106. <https://doi.org/10.1134/S0003683817010021>
- Al-Fakih, A. A., & Almaqtri, W. Q. A. (2019). Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology*, 10(4), 191–209. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604576>

- Alhadrami, H. A., Burgio, G., Thissera, B., Orfali, R., Jiffri, S. E., Yaseen, M., Sayed, A. M., & Rateb, M. E. (2022). Neoechinulin A as a Promising SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor: *In Vitro* and In Silico Study Showing the Ability of Simulations in Discerning Active from Inactive Enzyme Inhibitors. *Marine Drugs*, 20(3).
<https://doi.org/10.3390/md20030163>
- Almeida, C., Pérez-Victoria, I., González-Menéndez, V., de Pedro, N., Martín, J., Crespo, G., Mackenzie, T., Cautain, B., Reyes, F., Vicente, F., & Genilloud, O. (2018). Non-geminal Aliphatic Dihalogenation Pattern in Dichlorinated Diaporthins from *Hamigera fusca* NRRL 35721. *Journal of Natural Products*, 81(6), 1488–1492.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00041>
- Alshehri, B., & Palanisamy, M. (2020). Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.030>
- Amr, K., Ibrahim, N., Elissawy, A. M., & Singab, A. N. B. (2023). Unearthing the fungal endophyte *Aspergillus terreus* for chemodiversity and medicinal prospects: a comprehensive review. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1), 1–33.
<https://doi.org/10.1186/s40694-023-00153-2>
- Arai, K., Aoki, Y., & Yamamoto, Y. (1989). Asperinines A and B, dimeric tetrahydroanthracene derivatives from *Aspergillus ruber*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(3), 621–625. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.621>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2015). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Baranova, A. A., Alferova, V. A., Khayrova, A. S., Tyurin, A. P., Biryukov, M. V., Yuliya, V., Chistov, A. A., Novikov, R. A., & Korshun, V. A. (2021). Antibiotic activity of fungi associated with larva of black soldier fly *Hermetia illucens*. *The 1st International Electronic Conference on Antibiotics*, 41, 4–9.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390>
- Bazioli, J. M., Amaral, L. D. S., Fill, T. P., & Rodrigues-Filho, E. (2017). Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential. *Molecules*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/molecules22060858>
- Bennett, R. J., & Turgeon, B. G. (2016). Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiology Spectrum*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0005-2016>
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395.
<https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. In *The Fungal Kingdom* (pp. 1087–1119). ASM Press.
<https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54>
- Bovio, E., Fauchon, M., Toueix, Y., Mehiri, M., Varese, G. C., & Hellio, C. (2019). The Sponge-Associated Fungus *Eurotium chevalieri* MUT 2316 and its Bioactive Molecules: Potential Applications in the Field of Antifouling. *Marine Biotechnology*, 21(6), 743–752. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09920-y>
- Bovio, E., Garzoli, L., Poli, A., Luganini, A., Villa, P., Musumeci, R., McCormack, G. P., Cocuzza, C. E., Gribaudo, G., Mehiri, M., & Varese, G. C. (2019). Marine Fungi from the Sponge *Grantia compressa*: Biodiversity, Chemodiversity, and

Biotechnological Potential. *Marine Drugs*, 17(4), 220.

<https://doi.org/10.3390/md17040220>

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 21–32). Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>

Bruno, D., Bonelli, M., De Filippis, F., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Casartelli, M., Ercolini, D., & Caccia, S. (2019). The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), 1–14.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01864-18>

Bruns, T. (2006). Evolutionary biology: A kingdom revised. *Nature*, 443(7113), 758–761. <https://doi.org/10.1038/443758a>

Cai, M., Ma, S., Hu, R., Tomberlin, J. K., Thomashow, L. S., Zheng, L., Li, W., Yu, Z., & Zhang, J. (2018). Rapidly mitigating antibiotic resistant risks in chicken manure by *Hermetia illucens* bioconversion with intestinal microflora. *Environmental Microbiology*, 20(11), 4051–4062. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14450>

Cary, J. W., Gilbert, M. K., Lebar, M. D., Majumdar, R., & Calvo, A. M. (2018). *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites: More than Just Aflatoxins. *Food Safety*, 6(1), 7–32. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2017024>

Chen, A. J., Hubka, V., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Meijer, M., Varga, J., Demirel, R., Jurjević, Ž., Kubátová, A., Sklenář, F., Zhou, Y. G., & Samson, R. A. (2017). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *Studies in*

Mycology, 88(1), 37–135. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.001>

Chiang, Y. M., Ahuja, M., Oakley, C. E., Entwistle, R., Asokan, A., Zutz, C., Wang, C. C., & Oakley, B. R. (2016). Development of Genetic Dereplication Strains in *Aspergillus nidulans* Results in the Discovery of Aspercryptin. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(5), 1662–1665. <https://doi.org/10.1002/anie.201507097>

Choi, W. H., Choi, H. J., Goo, T. W., & Quan, F. S. (2018). Novel antibacterial peptides induced by probiotics in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Entomological Research*, 48(4), 237–247. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12259>

Choma, I., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225–238. <https://doi.org/10.3390/chromatography2020225>

Chovanová, K., & Zámocký, M. (2016). Detection of the antibacterial effect of *Chaetomium cochliodes* Palliser CCM F-232 based on agar plugs and unprocessed fungal substances from cultivation media. *Biologia (Poland)*, 71(11), 1204–1211. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0153>

Cifuentes, Y., Glaeser, S. P., Mvie, J., Bartz, J. O., Müller, A., Gutzeit, H. O., Vilcinskis, A., & Kämpfer, P. (2020). The gut and feed residue microbiota changing during the rearing of *Hermetia illucens* larvae. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(9), 1323–1344. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01443-0>

Correa, Y. (2018). *Aislamiento e identificación de hongos con actividad antibiótica provenientes del tracto digestivo de larvas de Hermetia illucens (orden: Diptera)* [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/3767>

- Correa, Y., Cabanillas, B., Jullian, V., Álvarez, D., Castillo, D., Dufloer, C., Bustamante, B., Roncal, E., Neyra, E., Sheen, P., & Sauvain, M. (2019). Identification and characterization of compounds from *Chrysosporium multifidum*, a fungus with moderate antimicrobial activity isolated from *Hermetia illucens* gut microbiota. *PLoS ONE*, *14*(12), e0218837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218837>
- da Silva, L. C., de Carvalho, T. C., Pereira, I., Marana, J. C., Laviola, B. G., Abdelnur, P. V., & Vaz, B. G. (2019). Molecularly Imprinted Polymer-Coated Probe Electro spray Ionization Mass Spectrometry Determines Phorbol Esters and Deoxyphorbol Metabolites in *Jatropha curcas* Leaves. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *30*(10), 2051–2059. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02269-5>
- De la Torre-Tarazona, H. E., Jiménez, R., Bueno, P., Camarero, S., Román, L., Fernández-García, J. L., Beltrán, M., Nothias, L. F., Cachet, X., Paolini, J., Litaudon, M., Alcamí, J., & Bedoya, L. M. (2020). 4-Deoxyphorbol inhibits HIV-1 infection in synergism with antiretroviral drugs and reactivates viral reservoirs through PKC/MEK activation synergizing with vorinostat. *Biochemical Pharmacology*, *177*, 113937. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113937>
- de Medeiros, A. G., Savi, D. C., Mitra, P., Shaaban, K. A., Jha, A. K., Thorson, J. S., Rohr, J., & Glienke, C. (2018). Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. *Folia Microbiologica*, *63*(4), 499–505. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0587-2>
- de Oliveira, L. A., Segundo, W. O. P. F., de Souza, É. S., Peres, E. G., Koolen, H. H. F., & de Souza, J. V. B. (2022). Ascomycota as a source of natural colorants. *Brazilian Journal of Microbiology*, *53*(3), 1199–1220. <https://doi.org/10.1007/s42770-022->

- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., & Van Campenhout, L. (2018). Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(9), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology* (4th ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Deshmukh, S. K., Dufossé, L., Chhipa, H., Saxena, S., Mahajan, G. B., & Gupta, M. K. (2022). Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. *Journal of Fungi*, *8*(2), 164. <https://doi.org/10.3390/jof8020164>
- Diclaro, J. W., & Kaufman, P. E. (2018). Black Soldier Fly - *Hermetia illucens*. Featured Creatures, Entomology & Nematology, University of Florida. https://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/black_soldier_fly.htm
- Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management and Research*, *27*(6), 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Ding, J., Zhou, H., Luo, L., Xiao, L., Yang, K., Yang, L., Zheng, Y., Xu, K., He, C., Han, C., Luo, H., Qin, C., Akinyemi, F. T., Gu, C., Zhou, Z., Huang, Q., & Meng, H. (2021). Heritable Gut Microbiome Associated with *Salmonella enterica* Serovar Pullorum Infection in Chickens. *MSystems*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01192-20>
- Du, F. Y., Li, X., Li, X. M., Zhu, L. W., & Wang, B. G. (2017). Indole-diketopiperazine alkaloids from *Eurotium cristatum* EN-220, an endophytic fungus isolated from the marine alga *Sargassum thunbergii*. *Marine Drugs*, *15*(2), 17–21.

<https://doi.org/10.3390/md15020024>

Du, F. Y., Li, X. M., Li, C. S., Shang, Z., & Wang, B. G. (2012). Cristatumins A-D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(14), 4650–4653.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.088>

Elsbaey, M., Sallam, A., El-Metwally, M., Nagata, M., Tanaka, C., Shimizu, K., & Miyamoto, T. (2019). Melanogenesis Inhibitors from the Endophytic Fungus *Aspergillus amstelodami*. *Chemistry and Biodiversity*, 16(8).

<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900237>

Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123.

<https://doi.org/10.3390/metabo9070123>

Fu, N., Wang, M., Wang, L., Luo, Y., & Ren, L. (2020). Genome Sequencing and Analysis of the Fungal Symbiont of *Sirex noctilio*, *Amylostereum areolatum*: Revealing the Biology of Fungus-Insect Mutualism. *MSphere*, 5(3), 1–15.

<https://doi.org/10.1128/mSphere.00301-20>

Gao, T., Cao, F., Yu, H., & Zhu, H.-J. (2017). Secondary Metabolites from the Marine Fungus *Aspergillus sydowii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(6), 1204–1207.

<https://doi.org/10.1007/s10600-017-2241-7>

Gao, Z., Deng, W., & Zhu, F. (2019). Reference gene selection for quantitative gene expression analysis in black soldier fly (*Hermetia illucens*). *PLoS ONE*, 14(8), 1–

14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221420>

- Gladun, V. V. (2019). The first record of *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae) from Russia. *Nature Conservation Research*, 4(4). <https://doi.org/10.24189/ncr.2019.063>
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323–1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Goel, G., Makkar, H. P. S., Francis, G., & Becker, K. (2007). Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*, 26(4), 279–288. <https://doi.org/10.1080/10915810701464641>
- Grabovyi, G. A., Bhatti, A., & Mohr, J. T. (2020). Total Synthesis of Benzofuran-Based Aspergillusene B via Halogenative Aromatization of Enones. *Organic Letters*, 22(11), 4196–4200. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01259>
- Gubiani, J. R., Teles, H. L., Silva, G. H., Young, M. C. M., Pereira, J. O., Bolzani, V. S., & Araujo, A. R. (2017). Cyclo-(Trp-Phe) diketopiperazines from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* isolated from *Piper aduncum*. *Quimica Nova*, 40(2), 138–142. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160165>
- Guo, R., Li, Z., Zhou, X., Huang, C., Hu, Y., Geng, S., Chen, X., Li, Q., Pan, Z., & Jiao, X. (2019). Induction of arthritis in chickens by infection with novel virulent *Salmonella Pullorum* strains. *Veterinary Microbiology*, 228(October 2018), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.032>
- Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Sousa, E., Fernandes, C., & Kijjoo, A. (2023). Peptides from Marine-Derived Fungi: Chemistry and Biological Activities. *Marine Drugs*, 21(10), 510. <https://doi.org/10.3390/md21100510>

- Haque, M. H., Sarker, S., Islam, M. S., Islam, M. A., Karim, M. R., Kayesh, M. E. H., Shiddiky, M. J. A., & Anwer, M. S. (2020). Sustainable antibiotic-free broiler meat production: Current trends, challenges, and possibilities in a developing country perspective. *Biology*, 9(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biology9110411>
- Harris, J. P., & Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 57(2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00004-8)
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2), 477–486. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63980-0>
- Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Phthalic acid esters: Natural sources and biological activities. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/toxins13070495>
- Huang, P., Zhang, Y., Xiao, K., Jiang, F., Wang, H., Tang, D., Liu, D., Liu, B., Liu, Y., He, X., Liu, H., Liu, X., Qing, Z., Liu, C., Huang, J., Ren, Y., Yun, L., Yin, L., Lin, Q., ... Zeng, J. (2018). The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzylisoquinoline alkaloids. *Microbiome*, 6(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0590-5>
- Hussein, M. M. A., Abd El-Hack, M. E., Mahgoub, S. A., Saadeldin, I. M., & Swelum, A. A. (2019). Effects of clove (*Syzygium aromaticum*) oil on quail growth, carcass traits, blood components, meat quality, and intestinal microbiota. *Poultry Science*, 98(1), 319–329. <https://doi.org/10.3382/ps/pey348>

- Jesionek, W., Móricz, Á. M., Ott, P. G., Kocsis, B., Horváth, G., & Choma, I. M. (2015). TLC-Direct Bioautography and LC/MS as Complementary Methods in Identification of Antibacterial Agents in Plant Tinctures from the Asteraceae Family. *Journal of AOAC International*, 98(4), 857–861.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE2-Choma>
- Kavanagh, K. (2018). *Fungi: Biology And Applications* (K. Kavanagh (ed.); 3rd ed.). Wiley Blackwell. <https://www.wiley.com/en-us/Fungi:+Biology+and+Applications,+3rd+Edition-p-9781119374329>
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167–180.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Kim, W., Bae, S., Park, H., Park, K., Lee, S., Choi, Y., Han, S., & Koh, Y. (2010). The Larval Age and Mouth Morphology of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *International Journal of Industrial Entomology*, 21(2), 185–187.
- Kinghorn, A. D. (1979). Characterization of an Irritant 4-Deoxyphorbol Diester From *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Natural Products*, 42(1), 112–115.
<https://doi.org/10.1021/np50001a006>
- Klüber, P., Müller, S., Schmidt, J., Zorn, H., & Rühl, M. (2022). Isolation of Bacterial and Fungal Microbiota Associated with *Hermetia illucens* Larvae Reveals Novel Insights into Entomopathogenicity. *Microorganisms*, 10(2), 319.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020319>
- Lecocq, A., Joosten, L., Schmitt, E., Eilenberg, J., & Jensen, A. B. (2021). *Hermetia*

illucens adults are susceptible to infection by the fungus *Beauveria bassiana* in laboratory experiments. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(1), 63–68.
<https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0042>

Li, H., Fu, Y., & Song, F. (2023). Marine *Aspergillus* : A Treasure Trove of. *Marine Drugs*, 21, 277.

Li, H. L., Li, X. M., Yang, S. Q., Meng, L. H., Li, X., & Wang, B. G. (2019). Prenylated Phenol and Benzofuran Derivatives from *Aspergillus terreus* EN-539, an Endophytic Fungus Derived from Marine Red Alga *Laurencia okamurai*. *Marine Drugs*, 17(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/md17110605>

Li, J. L., Jiang, X., Liu, X., He, C., Di, Y., Lu, S., Huang, H., Lin, B., Wang, D., & Fan, B. (2019). Antibacterial anthraquinone dimers from marine derived fungus *Aspergillus sp.* *Fitoterapia*, 133(December 2018), 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.015>

Liang, T. M., Fang, Y. W., Zheng, J. Y., & Shao, C. L. (2018). Secondary Metabolites Isolated from the Gorgonian-Derived Fungus *Aspergillus ruber* and Their Antiviral Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(3), 559–561.
<https://doi.org/10.1007/s10600-018-2406-z>

Lo, H. C., Entwistle, R., Guo, C. J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J. H., Chiang, Y. M., Oakley, B. R., & Wang, C. C. C. (2012). Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 134(10), 4709–4720. <https://doi.org/10.1021/ja209809t>

Lotfy, M. M., Hassan, H. M., Hetta, M. H., El-Gendy, A. O., & Mohammed, R. (2018).

Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*.

Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(3), 263–269.

<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.002>

Lu, J., Li, L., Pan, F., Zuo, G., Yu, D., Liu, R., Fan, H., & Ma, Z. (2020). PagC is involved in *Salmonella Pullorum* OMVs production and affects biofilm production.

Veterinary Microbiology, 247(January).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108778>

Ma, Y. M., Liang, X. A., Kong, Y., & Jia, B. (2016). Structural Diversity and Biological Activities of Indole Diketopiperazine Alkaloids from Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(35), 6659–6671. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01772>

Makky, E. A., AlMatar, M., Mahmood, M. H., Ting, O. W., & Qi, W. Z. (2021).

Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 59(2), 127–136.

<https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6658>

Marchelli, R., Dossena, A., Pochini, A., & Dradi, E. (1977). The structures of five new didehydropeptides related to neoechinulin, isolated from *Aspergillus amstelodami*.

Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 39(7), 713.

<https://doi.org/10.1039/p19770000713>

Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676–2683.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>

May Zin, W. W., Buttachon, S., Dethoup, T., Pereira, J. A., Gales, L., Inácio, Â., Costa,

- P. M., Lee, M., Sekeroglu, N., Silva, A. M. S., Pinto, M. M. M., & Kijjoo, A. (2017). Antibacterial and antibiofilm activities of the metabolites isolated from the culture of the mangrove-derived endophytic fungus *Eurotium chevalieri* KUFA 0006. *Phytochemistry*, *141*, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.015>
- Mitra, S., Anand, U., Sanyal, R., Jha, N. K., Behl, T., Mundhra, A., Ghosh, A., Radha, Kumar, M., Proćków, J., & Dey, A. (2022). Neoechinulins: Molecular, cellular, and functional attributes as promising therapeutics against cancer and other human diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *145*(November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112378>
- Mosquera, W. G., Criado, L. Y., & Guerra, B. E. (2020). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* (Calophyllaceae) y *Moringa oleifera* (Moringaceae). *Biomédica*, *40*(1), 55–71. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4644>
- Moubasher, A., Abdel-Sater, M., & Zeinab, S. (2017). Yeasts and filamentous fungi inhabiting guts of three insect species in Assiut, Egypt. *Mycosphere*, *8*(9), 1297–1316. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/9/4>
- Mudalungu, C. M., Tanga, C. M., Kelemu, S., & Torto, B. (2021). An Overview of Antimicrobial Compounds from African Edible Insects and Their Associated Microbiota. *Antibiotics*, *10*(6), 621. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060621>
- Müller, A., Wolf, D., & Gutzeit, H. O. (2017). The black soldier fly, *Hermetia illucens* - A promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *72*(9–10), 351–363. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>

- Myers, H. M., Tomberlin, J. K., Lambert, B. D., & Kattes, D. (2008). Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure. *Environmental Entomology*, *37*(1), 11–15. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[11:DOBSFD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[11:DOBSFD]2.0.CO;2)
- Nakazawa, T., Ishiuchi, K., Praseuth, A., Noguchi, H., Hotta, K., & Watanabe, K. (2012). Overexpressing Transcriptional Regulator in *Aspergillus oryzae* Activates a Silent Biosynthetic Pathway to Produce a Novel Polyketide. *ChemBioChem*, *13*(6), 855–861. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200107>
- Nassar, M. S. M., Hazzah, W. A., & Bakr, W. M. K. (2019). Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *Journal of the Egyptian Public Health Association*, *94*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s42506-018-0006-1>
- Nickles, G., Ludwikoski, I., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2021). Comprehensive Guide to Extracting and Expressing Fungal Secondary Metabolites with *Aspergillus fumigatus* as a Case Study. *Current Protocols*, *1*(12), 1–62. <https://doi.org/10.1002/cpz1.321>
- Nord, C., Levenfors, J. J., Bjerketorp, J., Sahlberg, C., Guss, B., Öberg, B., & Broberg, A. (2019). Antibacterial isoquinoline alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* EM19. *Molecules*, *24*(24), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24244616>
- Ortlieb, N., Klenk, E., Kulik, A., & Niedermeyer, T. H. J. (2021). Development of an agar-plug cultivation system for bioactivity assays of actinomycete strain collections. *PLOS ONE*, *16*(11), e0258934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258934>

- Pares, R. B., Alves, D. S., Alves, L. F. A., Godinho, C. C., Gobbo Neto, L., Ferreira, T. T., Nascimento, M. M., Ascari, J., & Oliveira, D. F. (2021). Acaricidal Activity of Annonaceae Plants for *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) and Metabolomic Profile by HPLC-MS/MS. *Neotropical Entomology*, 50(4), 662–672. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00885-z>
- Paudel, B., Maharjan, R., Rajbhandari, P., Aryal, N., Aziz, S., Bhattarai, K., Baral, B., Malla, R., & Bhattarai, H. D. (2021). Maculosin, a non-toxic antioxidant compound isolated from *Streptomyces sp.* KTM18. *Pharmaceutical Biology*, 59(1), 933–936. <https://doi.org/10.1080/13880209.2021.1946091>
- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., & Almeida-Aguiar, C. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.008>
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Parvathaneni, S. P., Koude, D., Sripadi, P., Misra, S., Amanchy, R., & Upadhyayula, S. M. (2017). Isolation and characterization of phthalates from *Brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. *EXCLI Journal*, 16, 375–387. <https://doi.org/10.17179/excli2017-145>
- Reina, J. C., Pérez-Victoria, I., Martín, J., & Llamas, I. (2019). A Quorum-Sensing Inhibitor Strain of *Vibrio alginolyticus* Blocks Qs-Controlled Phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Drugs*, 17(9), 494. <https://doi.org/10.3390/md17090494>
- Sánchez Espinosa, K. C., Chávez, M. A., Duarte-Escalante, E., Flores, T. I. R., Frías-Deleón, M. G., & Reyes-Montes, M. D. R. (2021). Phylogenetic identification, diversity, and richness of *Aspergillus* from homes in Havana, Cuba.

Microorganisms, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010115>

Savonen, C. (2005). *Big maggots in your compost? They're soldier fly larvae*. Oregon State University. <https://extension.oregonstate.edu/news/big-maggots-your-compost-theyre-soldier-fly-larvae>

Seong, W. R., Nam, Y. Do, Chang, H. W., Kim, K. H., Kim, M. S., Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, W. J., & Bae, J. W. (2008). Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6171–6177. <https://doi.org/10.1128/AEM.00301-08>

Sharifi-Rad, J., Bahukhandi, A., Dhyani, P., Sati, P., Capanoglu, E., Docea, A. O., Al-Harrasi, A., Dey, A., & Calina, D. (2021). Therapeutic Potential of Neoechinulins and Their Derivatives: An Overview of the Molecular Mechanisms Behind Pharmacological Activities. *Frontiers in Nutrition*, 8(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.664197>

Shen, X. X., Steenwyk, J. L., LaBella, A. L., Opulente, D. A., Zhou, X., Kominek, J., Li, Y., Groenewald, M., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota. *Science Advances*, 6(45). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABD0079>

Shi, Y. S., Zhang, Y., Chen, X. Z., Zhang, N., & Liu, Y. B. (2015). Metabolites produced by the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from the stem of *Erythrophloeum fordii* oliv. *Molecules*, 20(6), 10793–10799. <https://doi.org/10.3390/molecules200610793>

Shuai-Cheng, W., Xiu-Ling, C., Jian-Qing, S., Zong-Mei, W., Zhen-Jiang, Y., & Lian-

Tao, L. (2019). Saikosaponin A protects chickens against pullorum disease via modulation of cholesterol. *Poultry Science*, *98*(9), 3539–3547.

<https://doi.org/10.3382/ps/pez197>

Solomon, K. V., Haitjema, C. H., Henske, J. K., Gilmore, S. P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., Brewer, H. M., Purvine, S. O., Wright, A. T., Theodorou, M. K., Grigoriev, I. V., Regev, A., Thompson, D. A., & O'Malley, M. A. (2016). Early-branching gut fungi possess large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science*, *351*(6278), 1192–1195. <https://doi.org/10.1126/science.aad1431>

Sun, C., Ha, Y., Liu, X., Wang, N., Lian, X. Y., & Zhang, Z. (2024). Isolation and Structure Elucidation of New Metabolites from the Mariana-Trench-Associated Fungus *Aspergillus sp.* SY2601. *Molecules*, *29*(2), 1–12.

<https://doi.org/10.3390/molecules29020459>

Sun, C., Zhang, Z., Ren, Z., Yu, L., Zhou, H., Han, Y., Shah, M., Che, Q., Zhang, G., Li, D., & Zhu, T. (2020). Antibacterial Cyclic Tripeptides from Antarctica-Sponge-Derived Fungus *Aspergillus insulicola* HDN151418. *Marine Drugs*, *18*(11), 532.

<https://doi.org/10.3390/md18110532>

Suresh, G., Das, R. K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y., & Godbout, S. (2018). Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(3), 318–335.

<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1373062>

Tanga, C. M., Waweru, J. W., Tola, Y. H., Onyoni, A. A., Khamis, F. M., Ekesi, S., & Paredes, J. C. (2021). Organic Waste Substrates Induce Important Shifts in Gut Microbiota of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.): Coexistence of Conserved, Variable, and Potential Pathogenic Microbes. *Frontiers in Microbiology*,

12(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635881>

- Terova, G., Rimoldi, S., Ascione, C., Gini, E., Ceccotti, C., & Gasco, L. (2019). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota is modulated by insect meal from *Hermetia illucens* prepupae in the diet. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 29(2), 465–486. <https://doi.org/10.1007/s11160-019-09558-y>
- Tian, C., Ni, J., Chang, F., Liu, S., Xu, N., Sun, W., Xie, Y., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Z., Dang, C., Huang, Y., Tian, Z., & Wang, Y. (2016). Bio-Source of di-n-butyl phthalate production by filamentous fungi. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–8.
- Varotto Boccazzi, I., Ottoboni, M., Martin, E., Comandatore, F., Vallone, L., Spranghers, T., Eeckhout, M., Mereghetti, V., Pinotti, L., & Epis, S. (2017). A survey of the mycobiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *PLoS ONE*, 12(8), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182533>
- Wagner, J., Schäfer, D., von den Eichen, N., Haimerl, C., Harth, S., Oreb, M., Benz, J. P., & Weuster-Botz, D. (2021). D-Galacturonic acid reduction by *S. cerevisiae* for L-galactonate production from extracted sugar beet press pulp hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11433-5>
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2021). An Evolving Technology That Integrates Classical Methods Chromatography Bioautography. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 26, 1–21.
- Wang, R.-Z., Su, B.-J., Chen, Y.-C., Xiao, T.-M., Yan, B.-Y., Yu, L.-Y., Si, S.-Y., Wu, D.-L., & Chen, M.-H. (2023). Three new isocoumarin analogues from an

endolichenic fungus *Aspergillus flavus* CPCC 400810. *Natural Product Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2209820>

Wen, H., Yang, X., Liu, Q., Li, S., Li, Q., Zang, Y., Chen, C., Wang, J., Zhu, H., & Zhang, Y. (2020). Structurally Diverse Meroterpenoids from a Marine-Derived *Aspergillus sp.* Fungus. *Journal of Natural Products*, 83(1), 99–104. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00878>

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Wiese, J., Ohlendorf, B., Blümel, M., Schmaljohann, R., & Imhoff, J. F. (2011). Phylogenetic identification of fungi isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Marine Drugs*, 9(4), 561–585. <https://doi.org/10.3390/md9040561>

Wijesekara, I., Li, Y.-X., Vo, T.-S., Van Ta, Q., Ngo, D.-H., & Kim, S.-K. (2013). Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by neoechinulin A from marine-derived fungus *Microsporium sp.* *Process Biochemistry*, 48(1), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.11.012>

Wolfender, J.-L., Litaudon, M., Touboul, D., & Queiroz, E. F. (2019). Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products – new strategies for drug discovery. *Natural Product Reports*, 36(6), 855–868. <https://doi.org/10.1039/C9NP00004F>

Wu, Y., Chen, S., Liu, H., Huang, X., Liu, Y., Tao, Y., & She, Z. (2019). Cytotoxic isocoumarin derivatives from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus sp.*

HN15-5D. *Archives of Pharmacal Research*, 42(4), 326–331.

<https://doi.org/10.1007/s12272-018-1019-1>

Wu, Z., Li, D., Zeng, F., Tong, Q., Zheng, Y., Liu, J., Zhou, Q., Li, X. N., Chen, C., Lai, Y., Zhu, H., & Zhang, Y. (2018). Brasilane sesquiterpenoids and dihydrobenzofuran derivatives from *Aspergillus terreus* [CFCC 81836]. *Phytochemistry*, 156(August), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.006>

Xu, Z., Qin, Y., Wang, Y., Li, X., Cao, H., & Zheng, S. J. (2016). A critical role of bacterioferritin in *Salmonella Pullorum*-induced IFN- β expression in DF-1 cells. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00020>

Yan, L.-H., Du, F.-Y., Li, X.-M., Yang, S.-Q., Wang, B.-G., & Li, X. (2023). Antibacterial Indole Diketopiperazine Alkaloids from the Deep-Sea Cold Seep-Derived Fungus *Aspergillus chevalieri*. *Marine Drugs*, 21(3), 195. <https://doi.org/10.3390/md21030195>

You, L., Simmons, D. R., Bateman, C. C., Short, D. P. G., Kasson, M. T., Rabaglia, R. J., & Hulcr, J. (2015). New fungus-insect symbiosis: Culturing, molecular, and histological methods determine saprophytic polyporales mutualists of *Ambrosiodmus ambrosia* beetles. *PLoS ONE*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137689>

Youssef, F. S., & Singab, A. N. B. (2021). An Updated Review on the Secondary Metabolites and Biological Activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and Exploring the Cytotoxic Potential of Their Isolated Compounds Using Virtual Screening. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8860784>

- Yu, H., Wang, Z., Liu, L., Xia, Y., Cao, Y., & Yin, Y. (2008). Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current Microbiology*, 56(4), 391–396. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9078-4>
- Yu, X., Li, L., Sun, S., Chang, A., Dai, X., Li, H., Wang, Y., & Zhu, H. (2021). A Cyclic Dipeptide from Marine Fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 Exhibits Anti-quorum Sensing Activity. *ACS Omega*, 6(11), 7693–7700. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00020>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1–2), 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhao, W. Y., Zhu, T. J., Fan, G. T., Liu, H. B., Fang, Y. C., Gu, Q. Q., & Zhu, W. M. (2010). Three new dioxopiperazine metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* Fres. *Natural Product Research*, 24(10), 953–957. <https://doi.org/10.1080/14786410902726134>

X. ANEXOS

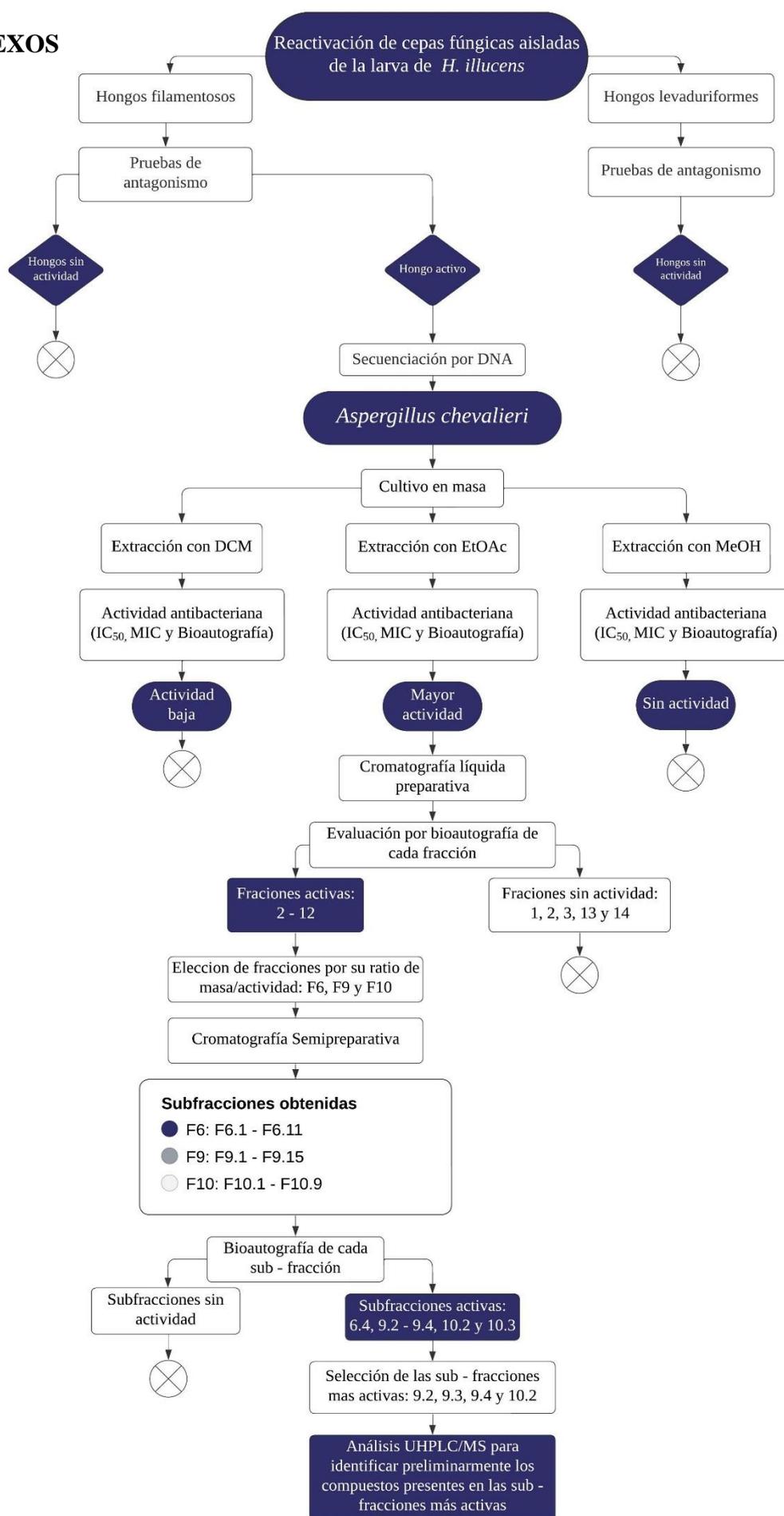


Figura S1. Flujo de trabajo con resultados

Tabla S1*Secuencias con alineamientos significativos del Gen de β -tubulina para la cepa HGUII_3*

Accesión	Descripción	Query Cover	E value	Per. Ident
KX455755.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> isolate VPCI 449/P/14 beta-tubulin (BT) gene, partial cds	99%	0	100.00%
KU872178.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain TGN9 beta-tubulin (B-tub) gene, partial cds	99%	0	100.00%
LC733669.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> Egy2-EU2 tub2 gene for beta-tubulin, partial cds	99%	0	100.00%
LC733668.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> Egy1-EU1 tub2 gene for beta-tubulin, partial cds	99%	0	100.00%
MZ027912.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain DTO 438-B1 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	99%	0	100.00%

Tabla S2*Coincidencias con alineamientos significativos del Gen de Calmodulina para la cepa HGUII_3*

Accession	Description	Query Cover	E value	Per. Ident
MK451334.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain CMV011B7 calmodulin gene, partial cds	100%	0	100%
MK451333.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain CMV011B6 calmodulin gene, partial cds	100%	0	100%
MK451332.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain CMV003I3 calmodulin gene, partial cds	100%	0	100%
MK951911.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> strain CMV016D7 calmodulin gene, partial cds	100%	0	100%
LC494259.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> M2 caM gene for calmodulin, partial cds	100%	0	100%

Tabla S3

Coincidencias con alineamientos significativos de la región ITS para la cepa HGUII_3

Accesión	Descripción	Query Cover	E value	Per. Ident
NR_135340.1	<i>Aspergillus chevalieri</i> NRRL 78 ITS region	100%	0	100.00%
NR_137448.1	<i>Aspergillus intermedius</i> NRRL 82 ITS region	100%	0	99.79%
NR_135434.1	<i>Aspergillus costiformis</i> CBS 101749 ITS region	99%	0	99.79%
NR_163674.1	<i>Aspergillus heterocaryoticus</i> CBS 410.65 ITS region	97%	0	100.00%
NR_135336.1	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> NRRL 40 ITS region	100%	0	98.97%

Tabla S4

Secuencias de la región ITS y de los genes de β -tubulin y Calmodulin para la cepa HGUII_3

Gen	Secuencia	Longitud bp
β -tubulin	ACGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCCGCATTATAATCAGAGTCAGATTGG GTGATATACTAACAGTATCACAGGCAGACTATCTCCGGCGAGCACGG TCTCGACGGCTCTGGTGTGTAAGTACAGTCGGGTCTCCGAGATGGAC GCGTATCGGATATGGATATCTAAATGGATTGCAGCTACAATGGCTCCT CCGACCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTTGC CTAATTCATTTCGTGTCTGTGTGGGAAACAGTTCTGACAGTGACAGGC CTCCAACAACAAATATGTCCCCCGTGCCGTCCTCGTCGACCTTGAGC CCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCCAGCTCTTC CGTCCCAGATAACTTCGTTTTTCGGTCAGTCCGGTGCCGGTAACAACCTG GGCCAAGGGTCACTA	440
Calmodulin	CTTCGTAAGTGCGCTGGCCATCTCCATGTGGCATTTCCTCCCGTCCGGC TTGAGGGCAGTAAACTGACCACGATTTCTGCATTTCTACAGGACAAG GATGGCGATGGTTAGTGATCCCGCTCTACTCTGCATCAAATGCCTCTT TACTCCACCATTTCGATTGGTTCCGACCGTGATATCATATTCGCTGTTG AAATAATATCTTTCCGGTTAACGACATAATACTGATGGATCTCTGCGAT TACAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTTATGCGCTCGC TGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCCGAGTTGCAGGACATGATCAACGA GGTTGACGCTGACAACAACGGCACCATTGATTTCCCTGGTATGCGAT CGTCCCAGCATGAAAGGTCCCGTAACAAGATAGGCGATTCTGACCAT ACTAGAATTCCTTACCATGATGGCACGGAAGATGAAGGACACCGATT CCGAGGAAGAGATCCGGGAAGCTTTCAAGGTCTTCGATCGCGACAA CAACGGTTTCATTTCCGCTGCGGAGCT	548
ITS	TTACCGAGTGCGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGTCTATCT GTACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGCCGGAGACTAACATT TGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAACAATCG TTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCA TGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTG GGCTTCCGTCCCTGGCAACGGGGACGGGCCAAAAGGCAGTGGCG GCACCATGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCC GTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTAAACCAGG TTGACCTCGGATCAGGTA	487

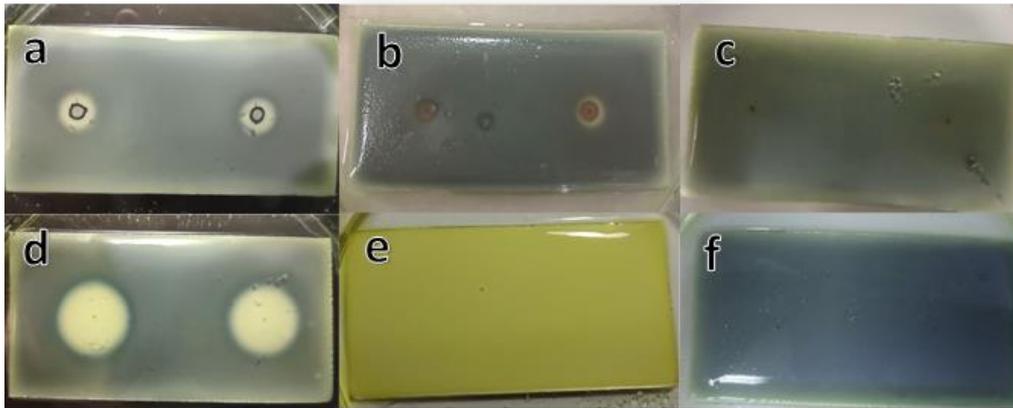


Figura S1. Bioautografía de los extractos crudos de *Aspergillus chevalieri*. a. Bioautografía del extracto crudo de EtOAc; **b.** DCM; **c.** MeOH; **d.** Droga de referencia: Tetraciclina; **e.** Control de esterilidad; **f.** Control de crecimiento

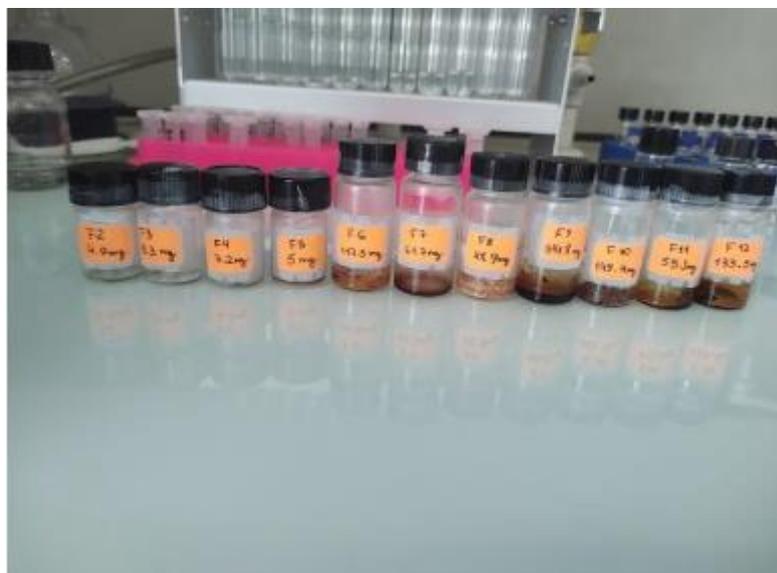


Figura S2. Viales con las fracciones activas obtenidas de extracto EtOAc de *Aspergillus chevalieri*

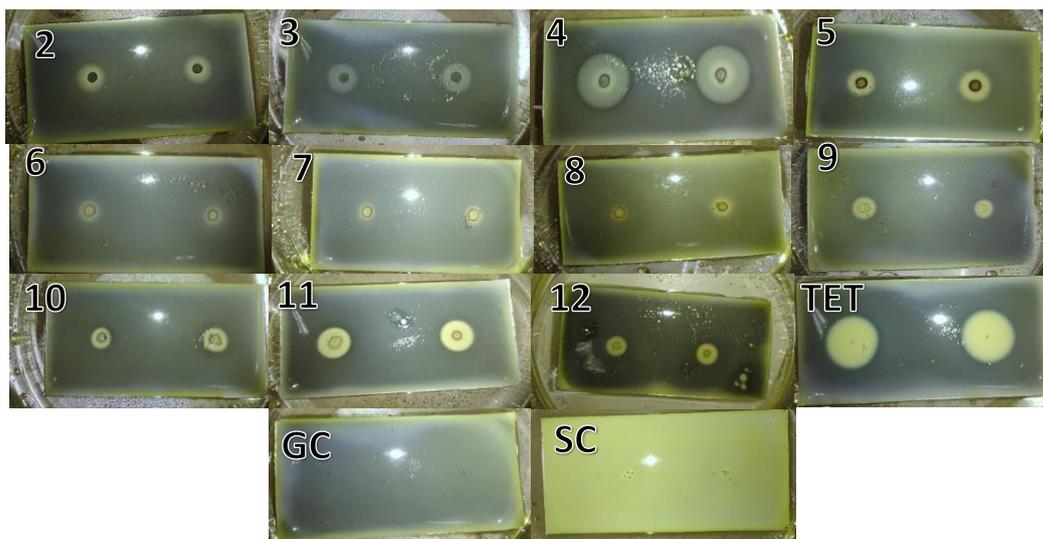


Figura S3. Bioautografía de las fracciones del extracto EtOAc de *Aspergillus chevalieri*. 2-12: Fracciones activas del extracto EtOAc; TET: Droga de referencia

Tabla S5

Promedios del diámetro del halo de inhibición (mm) de las fracciones F2 a F12 y TET.

Fracción	Promedio (mm)
F2	7.6 ± 0.2
F3	8.2 ± 0.3
F4	14.8 ± 0.6
F5	8.3 ± 0.6
F6	5.3 ± 0.5
F7	4.3 ± 0.7
F8	4.8 ± 0.4
F9	6.2 ± 0.6
F10	6.7 ± 0.8
F11	9.1 ± 0.3
F12	6.6 ± 0.2
TET	14.4 ± 0.2

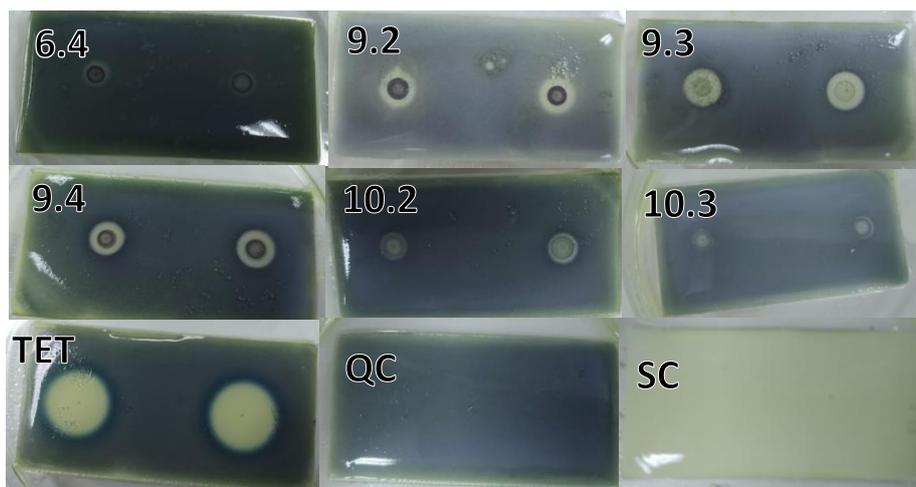


Figura S4. Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de las fracciones F6, F9 y F10. 6.4, 9.2, 9.3, 9.4, 10.2 y 10.3: Sub-Fracciones activas; TET: Droga de referencia (tetraciclina); GC: Control de crecimiento; SC: Control de esterilidad

Tabla S6

Promedios del diámetro del halo de inhibición (mm) de las sub-fracciones y TET

Sub-fracción	Promedio (mm)
F6.4	6.2 ± 0.2
F9.2	8.2 ± 0.2
F9.3	9.1 ± 0.2
F9.4	8.6 ± 0.6
F10.2	6.8 ± 0.4
F10.3	5.7 ± 0.2
TET	15.7 ± 0.5

Tabla S7*Ventajas y desventajas de las diversas técnicas de bioautografía*

Técnica	Ventajas	Desventajas
Difusión en agar	<ul style="list-style-type: none"> • Método simple y económico. • Permite visualizar zonas de inhibición por difusión del compuesto antimicrobiano en el agar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Menos utilizado y confiable. • Difusión limitada del agente antimicrobiano, lo que reduce la precisión. • Menor efectividad en algunos tipos de microorganismos.
Bioautografía Directa	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica más común y fácil de realizar. Ideal para detectar sustancias antifúngicas y antibacterianas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere condiciones específicas de incubación y humedad. • Necesita tiempos de incubación largos (2 a 3 días), lo que prolonga el proceso.
Bioautografía de superposición en agar	<ul style="list-style-type: none"> • Combina ventajas de las otras dos técnicas, con alta efectividad. • Proporciona zonas de inhibición bien definidas y fáciles de identificar. • Menos sensible a la contaminación y con alta precisión. • Requiere un equipo mínimo y puede usarse tanto en laboratorios sofisticados como básicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere preparación adicional (por ejemplo, pre-incubación opcional a baja temperatura para permitir la difusión en el agar).
TLC-DB "dot-blot"	<ul style="list-style-type: none"> • Método simplificado y rápido, ideal para pruebas preliminares. • Permite evaluar la actividad antibacteriana de mezclas sin desarrollar la placa TLC. • Útil para indicar si un extracto merece investigación adicional. • Posibilidad de realizar mediciones cuantitativas del halo de inhibición • Brinda valores comparativos entre 2 o más extractos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solo produce resultados preliminares, lo que puede limitar la información obtenida. • Los efectos sinérgicos o antagónicos entre los compuestos de una mezcla pueden enmascarar las propiedades de compuestos individuales. • La zona de inhibición depende del volumen aplicado.
TLC-DB en placas desarrolladas	<ul style="list-style-type: none"> • Proporciona información más precisa sobre la actividad de compuestos individuales en mezclas complejas • Permite detectar componentes activos específicos, evitando el enmascaramiento de actividad por la mezcla. • Herramienta efectiva y económica para el análisis bio-dirigido en mezclas complejas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere desarrollar la placa TLC, lo que aumenta el tiempo de análisis. • En algunos casos, es necesario utilizar cromatografía preparativa o semi-preparativa para obtener cantidades mayores de fracciones activas para análisis posteriores, como espectroscopia.