



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
 DE HONGOS CON ACTIVIDAD
 ANTIBIÓTICA PROVENIENTES DEL
 TRACTO DIGESTIVO DE LARVAS DE
 Hermetia illucens (ORDEN: DIPTERA)**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

YESENIA DEL MILAGRO CORREA
VÁSQUEZ

LIMA - PERÚ

2018

ASESOR DE TESIS

PhD. MICHEL SAUVAIN

Director del Laboratorio Mixto Internacional LAVI “Laboratorio Andino
Amazónico de Química de la Vida” IRD-UPCH.

Director de Investigación en el IRD (DR1)

*A mis padres Leopoldo e Yrma,
Por darme lo mejor de este mundo para ser libre “Mi educación”.
Por su apoyo y rezos constantes para que logre mis objetivos.
Porque cada felicidad mía también es la suya. Gracias papá y mamá.*

*A mis hermanos Rafael y David; por ser mis compañeros eternos, porque sin
ustedes mi vida no hubiera sido tan divertida.*

*A vaini y Gumi, por pasar conmigo tantas malas noches y ser las caras más
sonrientes que he visto por las mañanas.*

*Y a Paulo Manrique,
Por ser mi esencia en diferente color. Por estar conmigo en los días lluviosos y
soleados, enseñándome que la vida es más bonita si caminamos juntos.*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Michel Sauvain, por su guía y confianza en el desarrollo de esta tesis y por darme la oportunidad de ser parte de un grupo multidisciplinario; así como también el motivar las investigaciones en BSF.

A Denis Castillo, por ser la persona que me apoyó y aconsejó en momentos difíciles. Por ser la primera persona que logró ver en mí, la capacidad para desarrollar investigación en el LMI-LAVI.

A la Dra. Beatriz Bustamante y al Mg. Edgar Neyra por dedicarme un poco de su tiempo y por brindarme asesoramiento en el campo en que se desempeñan.

Al laboratorio de Micología médica, en especial a la Tec. Med. Susy Aranibar y Tec. Lab. Elena Grigoletto, por brindarme su amistad, sus conocimientos y sus consejos. Ustedes han sido las personas más acogedoras que he conocido.

A mis amigos del laboratorio LMI-LAVI: Inés Castro, Daniela Álvarez, Romina Pacheco, Carlos Yauri, Karina Cansino, Jesús Guzmán, Maricruz Olano, Daniel Matos, Kevin Gil y Manuel Chu, por compartir tantos buenos momentos juntos que hacen del trabajo un lugar acogedor. Me siento muy afortunada de conocerlos, porque no sólo son excelentes personas sino grandes profesionales.

Un especial agradecimiento a Milagros Carrillo, por ser la amiga incondicional que ha tratado con todas las bondades y dificultades por las que he pasado en el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias por haber elegido ser parte de este proyecto y ser mi compañera en todo y porque nadie más que tú sabe lo satisfactorio que es cerrar este ciclo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente tesis de maestría fue financiada por CIENCIATIVA como parte del proyecto 108-2015-CIENCIATIVA, así mismo fue financiada parcialmente por el Laboratorio Mixto Internacional Andino Amazónico de química de la Vida (LMI-LAVI) en asociación con el Instituto de investigación para el desarrollo de Francia (IRD) y la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO.....	6
3.1. La mosca soldado negra: <i>Hermetia illucens</i> (Orden: Diptera)	6
3.1.1. Ciclo de vida del insecto	7
3.1.2. Importancia de la utilización de <i>H. illucens</i>	8
3.2. Microflora intestinal de insectos.....	9
3.3. Los insectos como posibles fuentes de antibióticos	10
3.4. Hongos.....	10
3.4.1. Desarrollo morfológico	11
3.4.1.1. Hongos levaduriformes.....	11
3.4.1.2. Hongos filamentosos.....	12
3.4.2. Dimorfismo sexual.....	12
3.4.3. Clasificación	13
3.4.3.1. Filo Ascomycota.....	13
3.4.3.2. Filo Basidiomycota	15
3.4.3.3. Otros Filos	16
3.4.4. Hongos productores de antibióticos.....	17

3.5. Técnicas para detectar antagonismo entre microorganismos	18
4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	20
5. HIPOTESIS.....	21
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo general.....	21
6.2. Objetivos específicos	21
7. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	22
7.1. Diseño de investigación.....	22
7.2. Población	24
7.3. Muestras biológicas	24
7.3.1. Larvas del insecto.....	24
7.3.2. Cepas bacterianas ATCC	25
7.4. Procedimientos y técnicas.....	25
7.4.1. Crianza y selección de larvas de <i>H. illucens</i>	25
7.4.2. Aislamiento de cepas fúngicas a partir del intestino de <i>H. illucens</i> .	26
7.4.2.1. Extracción del tubo digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	26
7.4.2.2. Aislamiento de cepas fúngicas.....	27
7.4.2.3. Preservación y recuperación de los hongos.....	28
7.4.3. Caracterización morfológica e identificación molecular de las cepas fúngicas.....	29
7.4.3.1. Caracterización morfológica	29

7.4.3.1.1. Caracterización macroscópica	29
7.4.3.1.2. Caracterización microscópica	30
7.4.3.2. Identificación molecular de las especies de hongos aislados del intestino de <i>H. illucens</i>	31
7.4.3.2.1. Extracción del ADN fúngico	31
7.4.3.2.2. Verificación de integridad de ADN genómico mediante electroforesis	33
7.4.3.2.3. Amplificación de ADN fúngico	33
7.4.3.2.4. Secuenciamiento y análisis bioinformático del ADN fúngico	35
7.4.4. Pruebas de antagonismo de hongos contra bacterias patógenas	36
7.4.4.1. Pruebas de antagonismo para hongos levaduriformes	36
7.4.4.2. Pruebas de antagonismo para hongos filamentosos	38
7.4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana a partir del extracto crudo de acetato de etilo proveniente del cultivo puro del hongo con actividad promisorio.	40
7.4.5.1. Cultivo líquido del hongo	40
7.4.5.2. Partición Líquido-Líquido (55).....	42
7.4.5.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	42
7.4.5.3.1. Técnica de la bioautografía.	42
7.4.5.3.2. Determinación del IC50.....	45

7.4.5.3.3. Determinación del MIC (57).....	46
7.5. Análisis estadístico	47
8. RESULTADOS.....	48
8.1. Aislamiento de hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	48
8.2. Caracterización e identificación molecular de las cepas fúngicas obtenidas.....	49
8.2.1. Caracterización macroscópica y microscópica.	49
8.2.2. Identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas	58
8.3. Pruebas de antagonismo frente a patógenos bacterianos ATCC	65
8.4. Evaluación antibacteriana del hongo promisorio	71
9. DISCUSIÓN	76
10. CONCLUSIONES	91
11. RECOMENDACIONES.....	92
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	93
13. ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplares de <i>Hermetia illucens</i>	6
Figura 2: Ciclo de vida de <i>H. illucens</i> en condiciones de laboratorio.	7
Figura 3: Reproducción sexual y asexual de un Ascomycota del género <i>Aspergillus</i>	14
Figura 4: Ciclo de vida de un basidiomyceto del género <i>Agaricus</i>	16
Figura 5: Esquema general de la metodología realizada.....	23
Figura 6: Fisiología del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	27
Figura 7: Esquema de cebadores empleados para la amplificación y secuenciamiento de genes ribosomales fúngicos.	34
Figura 8: Pruebas de antagonismo entre hongos y bacterias patógenas.	36
Figura 9: Representación gráfica del antagonismo esperado en el enfrentamiento fúngico contra la bacteria patógena seleccionada.....	38
Figura 10: Proceso de producción del extracto crudo del hongo activo.	41
Figura 11: Cepas fúngicas obtenidas en diferentes diluciones.	48
Figura 12: Productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de ADN de hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de <i>H. illucens</i>	58
Figura 13: Composición taxonómica de la microbiota intestinal de larvas de <i>H.</i> <i>illucens</i>	60
Figura 14: Determinación de los halos de inhibición catalogados según su transparencia.....	65
Figura 15: Potencial antimicrobiano de hongos levaduriformes aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GS.	67

Figura 16: Potencial antimicrobiano de hongos levaduriformes aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU.....	68
Figura 17: Potencial antimicrobiano de hongos filamentosos aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU.....	70
Figura 18: Bioautografía por punto del extracto crudo del hongo.....	73
Figura 19: Perfil del extracto crudo del hongo HGU11_8 en TLC.	74
Figura 20: Comparación del perfil del TLC con la bioautografía por corrida de solventes del extracto crudo.	75

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Descripción macroscópica de las colonias fúngicas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GS	52
Tabla N° 2: Descripción microscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GS	53
Tabla N° 3: Descripción macroscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GU	54
Tabla N° 4: Descripción microscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GU	56
Tabla N° 5: Identificación molecular de cepas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con GS.....	62
Tabla N° 6: Identificación molecular de cepas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	:	Microlitros
μg	:	Microgramos
°C	:	Grados centígrados
Ac	:	Absorbancia del control de crecimiento de la bacteria patógena
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ASB	:	Agar Sabouraud
APD	:	Agar papa dextrosa
Am	:	Absorbancia de las bacterias patógenas expuestas al extracto crudo.
AN	:	Agar nutritivo
ATCC	:	American Type Culture Collection
BSF	:	Black Soldier Fly o Mosca soldado negra
cm	:	Centímetros
CMH	:	Caldo Muller Hinton
CSB	:	Caldo Sabouraud
DH	:	Diámetro del hongo
DI	:	Diámetro de inhibición
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
GS	:	Alimento comercial para aves
GU	:	Guano de gallina
HCl	:	Ácido clorhídrico.
IC50	:	Concentración inhibitoria media
IRD	:	Instituto de Investigación para el desarrollo

ITS : Internal transcribed spacer

L : Litro

LMI-LAVI : Laboratorio Mixto Internacional- Laboratorio Andino Amazónico
de Química de la vida.

MDR : Multidrogo resistente

mg : Miligramos

MIC : Concentración mínima inhibitoria

mL. : Mililitros

mM : Milimolar

mm : Milímetros

MRSA : *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina

MTT : Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio

NaCl : Cloruro de sodio

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ng : Nanogramos

nm : Nanómetros

OD : Densidad óptica

OMS : Organización Mundial de la salud

p25 : Percentil 25%

p75 : Percentil 75%

pb : Pares de bases

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.

pH : Potencial de Hidrógeno

PHF : Phusion High-Fidelity

RI : Rango intercuartil
Rpm : Revoluciones por minuto
TAE : Tris-Acetato-EDTA
TLC : Cromatografía en capa fina
ufc : Unidades formadoras de colonias
UV : Luz ultravioleta
V : Voltios
YEPD : Extracto de levadura peptona dextrosa.

RESUMEN

La microbiota intestinal de las larvas de *Hermetia illucens* es capaz de eliminar a patógenos bacterianos encontrados en los residuos orgánicos de los cuales se alimenta; mostrando que el intestino de estas larvas es un nicho interesante para la selección de microorganismos con capacidades antimicrobianas. Poco se sabe de la microbiota intestinal de la larva de *H. illucens*, la cual podría participar en la eliminación de patógenos. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* alimentadas con dos dietas diferentes, alimento comercial para aves (GS) y guano de gallina (GU); además se evaluó el potencial antimicrobiano (PA) de cada cepa fúngica contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. La levadura *Pichia kudriavzevii*, encontrada en la microbiota intestinal de larvas alimentadas con GS, presentó la mayor actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 (PA=1.92±0.04). Mientras que una cepa filamentosa del orden Onygenales, encontrada en la microbiota intestinal de larvas alimentadas con GU, mostró la mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 13311 (PA=1.42±0.03). La actividad antimicrobiana del extracto crudo de esta cepa contra *S. aureus* ATCC 13311 fue confirmada mediante la técnica de microdilución en caldo (IC50=1.6±0.16 mg/mL y MIC=4 mg/mL). Este estudio muestra que las larvas de *H. illucens* podrían seleccionar a microorganismos fúngicos con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311.

PALABRAS CLAVE: Microbiota intestinal, *Hermetia illucens*, Actividad antimicrobiana, Bioautografía.

ABSTRACT

The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae has shown to be able of eliminating bacterial pathogens found in the organic waste on which they feed; thus, the intestine of these larvae is an interesting niche for the selection of microorganisms with antimicrobial capabilities. Little is known about the intestinal mycobiota of *H. illucens* larvae, which may be involved in the elimination of pathogens. The objective of the present study was to isolate and identify fungi from the digestive tract of *H. illucens* larvae fed with two different diets, commercial chicken feed (GS) and chicken guano (GU); in addition, the antimicrobial potential (PA) of each fungal strain was evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. The yeast *Pichia kudriavzevii* found as part of the intestinal mycobiota of GS-fed larvae, showed the highest antimicrobial activity against *S. Typhimurium* ATCC 13311 (PA=1.92±0.04). While, a filamentous strain of Onygenales order of GU-fed larvae, showed the highest antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 43300 (AP=1.42±0.03). The antimicrobial activity of the crude extract of the filamentous strain against *S. aureus* ATCC 43300 was confirmed by broth microdilution technique (IC₅₀=1.6±0.16mg/mL and MIC=4mg/mL). This study shows that *H. illucens* larvae might select fungal microorganisms with antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 43300 and *S. Typhimurium* ATCC 13311.

KEY WORDS: Intestinal mycobiota, *Hermetia illucens*, Antimicrobial activity, Bioautography.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos ocurrió en el año 1929 con el compuesto conocido como Penicilina, revolucionando el tratamiento de enfermedades bacterianas, y generando una mejora para la salud pública y la medicina. Desde entonces su uso ha reducido la mortalidad por enfermedades infecciosas, pero lamentablemente su empleo inadecuado ha generado la selección de cepas resistentes a diversos medicamentos. En la actualidad más del 70% de bacterias patógenas son resistentes a la mayoría de antibióticos del mercado (1), denominándolas cepas multidrogo-resistentes (MDR). Esto provocó un interés creciente en la búsqueda de nuevas drogas antimicrobianas (2); sin embargo, estos “nuevos” compuestos antimicrobianos, resultaron ser igualmente ineficaces por tener una estructura y función parecida a los antibióticos comerciales ya existentes. Dichos compuestos eran aislados generalmente de ambientes anteriormente explorados, por lo que una de las alternativas para evitar este problema es concentrarse en explorar nichos poco conocidos que puedan ofrecer variedades interesantes de compuestos antimicrobianos (1).

En este contexto, las larvas del díptero *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly o BSF por sus siglas en inglés), utilizadas en la bioconversión de desechos orgánicos, han mostrado la capacidad de producir sustancias antimicrobianas originadas en su tracto digestivo (2-4), gracias a la microbiota propia de dicho ecosistema. Las sustancias producidas actúan como defensa y previenen la colonización de los patógenos propios de su medio ambiente; por este motivo, la larva de BSF es un

sistema biológico candidato para la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos.

La diversidad bacteriana intestinal de esta mosca ha sido caracterizada por diversos autores (4-6); sin embargo, la diversidad fúngica no ha sido aún reportada a pesar de ser uno de los grupos más prometedores en la producción de compuestos útiles para el hombre (7, 8). En la actualidad, los hongos son considerados como uno de los grupos microbianos con mayor aporte de metabolitos bioactivos (42%). De este porcentaje el 35% es producido por Basidiomicetos y el 75% es producido por hongos filamentosos. El 99% de metabolitos producidos por hongos filamentosos han sido aislados de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (1). Además, los hongos son poseedores de un largo número de genes que codifican varias vías metabólicas que generan numerosos metabolitos secundarios por cada especie fúngica (9), mostrando de esta manera la gran diversidad que ofrece para su investigación.

Por este motivo, en el presente estudio se ha aislado e identificado cepas fúngicas propias del tracto digestivo de la larva de *H. illucens*. Además, se ha determinado su actividad antimicrobiana frente a los patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 (abreviada como *S. aureus* ATCC 43300) y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. Typhimurium ATCC 13311 (abreviada como *S. Typhimurium* ATCC 13311). Los resultados proporcionan especies con nuevos comportamientos antimicrobianos que podrían ser utilizados como fuente de compuestos alternativos para lidiar con el problema de la resistencia microbiana.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 1929 se inició la era de los antibióticos gracias al descubrimiento de la actividad antimicrobiana del hongo filamentoso *Penicillium notatum* contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (8), posteriormente se supo que su actividad provenía de un metabolito secundario activo secretado por el hongo al que llamaron Penicilina. Su utilización y aprovechamiento revolucionó el tratamiento de enfermedades bacterianas como la escarlatina, gonorrea, heridas infectadas y neumonía (10). Posteriormente, el descubrimiento de diversos antibióticos y su uso paulatino, no sólo han reducido la mortalidad por enfermedades infecciosas sino también han generado la selección de cepas resistentes a diversos medicamentos o multidrogo-resistentes (MDR). Por este motivo, la OMS considera que el desarrollo de estas resistencias puede generar un aumento de la mortalidad mundial en los próximos 30 años si no se da énfasis a investigaciones básicas y aplicadas sobre nuevos antibióticos capaces de superar estas resistencias, además incentiva a promover el uso adecuado de los medicamentos existentes (11).

En el Perú el problema de la resistencia antimicrobiana es aún más serio, puesto que los niveles de bacterias resistentes a diversos fármacos son mayores y con menos estrategias de eliminación y prevención que en países desarrollados. Entre las bacterias con más porcentaje de resistencias de importancia en salud pública tenemos a *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria es un patógeno Gram positivo y es el agente etiológico de diversas patologías incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, entre otros (12, 13). Este patógeno es uno de los

principales agentes infecciosos en las enfermedades intrahospitalarias, y genera altas tasas de resistencia a las drogas administradas para su eliminación. Tan sólo en el período del 2008-2009, el 50% de los aislados a partir de sangre en varios hospitales de Lima eran resistentes a meticilina (14). Por otro lado, entre las bacterias Gram negativas encontramos a las *Salmonellas* no typhi con historiales de resistencia a múltiples antimicrobianos. Específicamente *Salmonella enterica* variedad Typhimurium es responsable de diarreas en pacientes inmunocomprometidos (14) y se ha reportado su asociación con resistencias hacia Ampicilina, Cloranfenicol, Neomicina, Tetraciclina y Sulfa-trimetropim (15).

Además, desde el año 2000, la eficiencia de búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos decreció ya que ocurrían muchos redescubrimientos de compuestos ya conocidos, mientras que los pocos “descubrimientos nuevos” no eran más que una variación de otros antibióticos igualmente ineficaces en el tratamientos de patógenos (16). El fracaso en el descubrimiento de nuevos compuestos antibióticos se debería a que la búsqueda se realizaba en nichos explorados con anterioridad y que no aportaban nada nuevo. Tal fue el caso de la búsqueda de antibióticos a partir de microorganismos aislados de suelo que durante 20 años aportó un número significativo de compuestos nuevos como la estreptomicina, sin embargo llegó un punto en el que el rendimiento de descubrimientos de antibióticos disminuyó debido al redescubrimiento de compuestos conocidos (17).

Por este motivo, consideramos que el principal problema de urgencia nacional e internacional es enfrentar la resistencia microbiana, teniendo a disposición nuevos compuestos que propongan su eliminación y que sean eficaces. Para esto, el estudio

de microorganismos como los hongos microscópicos, ha sido desde el inicio uno de los sistemas con una producción de compuestos activos bastante grande. Además, se sabe que los hongos son cosmopolitas, pudiendo ser encontrados en diversos ecosistemas que aún no han sido explorados. En adición a esto, se ha reportado sistemas que incluyen insectos con la capacidad de producir sustancias antimicrobianas dentro de su tracto digestivo para prevenir infecciones microbianas en diversas etapas de su ciclo de vida (18-20).

Ante esta problemática se planteó el aislamiento e identificación de la microflora fúngica del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* como posibles productores de nuevos perfiles antibióticos que pudieran lidiar con la resistencia bacteriana.

3. MARCO TEORICO

3.1. La mosca soldado negra: *Hermetia illucens* (Orden: Diptera)

Hermetia illucens (Linnaeus, 1758; Orden Diptera; Familia Stratiomyidae) o también llamada mosca soldado negra o BSF (Figura 1), es originaria de América del Norte (sur de EE.UU) y logró expandirse por muchos lugares del mundo incluyendo el Perú (21, 22). Esta especie no se encuentra asociada a la transmisión de ninguna enfermedad humana a pesar de que sus larvas pueden desarrollarse en desechos orgánicos, por lo que se considera inofensiva.

Además, no representa ningún tipo de amenaza para el ser humano ya que su hábitat natural se encuentra dentro de los bosques y no es propensa a ingresar a las casas ni generar algún tipo de contacto con el hombre. En la etapa adulta no cuenta con segmentos bucales funcionales por lo que no puede alimentarse de basura ni generar algún tipo de picaduras (21).

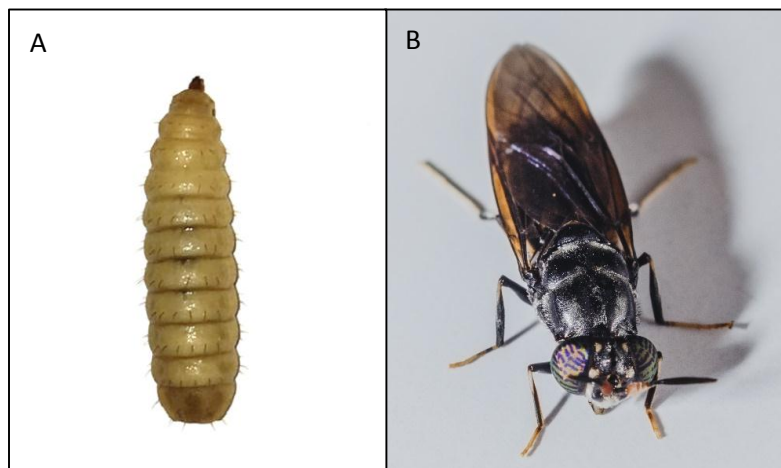


Figura 1: Ejemplares de *Hermetia illucens*.
(A)Estadio larval y (B) estadio adulto. Fuente: Propia

3.1.1. Ciclo de vida del insecto

Su ciclo de vida completo dura aproximadamente mes y medio en condiciones de laboratorio con parámetros de luz, temperatura y humedad controladas. El ciclo consta de 4 fases propias de un insecto holometábolo o de metamorfosis completa (2), iniciando en el estadio de huevo, larva, pupa y por último imago (insectos adultos).



Figura 2: Ciclo de vida de *H. illucens* en condiciones de laboratorio.

Las moscas adultas se aparean dentro de Jaulas de crianza, las hembras ponen huevos en conjunto (clústers) los mismos que luego eclosionan en microlarvas que son alimentadas para que puedan desarrollarse desde L1-L6 posteriormente son colectadas e ingresadas en sistemas oscuros para facilitar la pupación; por último luego de la metamorfosis emergen nuevamente las moscas adultas.

Los huevos depositados por los adultos suelen estar conglomerados en “Clusters” que eclosionan en 2-4 días después de haber sido ovipositados. De ellos salen unas

larvas minúsculas conocidas como “microlarvas” que miden aproximadamente 0.5 mm. Estas larvas desarrollan 6 subestadios en un lapso de 2 semanas (L1, L2, L3, L4, L5 y L6 o prepupa) y son las que se utilizan para la degradación de desechos orgánicos (Figura 1A). Una vez que llegan a ser prepupas, buscan un lugar seco para pasar al estadio de pupa y realizar la metamorfosis que demora aproximadamente 2 semanas, para luego emerger los imagos o insectos adultos. Éstos últimos tienen como función principal la reproducción y proliferación de la especie, teniendo 2 semanas como tiempo estimado de vida (Figura 1B). En este tiempo el adulto no se alimenta, sólo se hidrata con líquidos dulces o con agua, por lo que no suelen ser los transmisores de enfermedades a través del consumo de alimentos (21-23).

3.1.2. Importancia de la utilización de *H. illucens*

La importancia científica, biotecnológica y económica de esta mosca radica en sus larvas; puesto que no sólo son utilizadas en la bioconversión de desechos orgánicos, sino que a partir de este proceso se genera el aumento de biomasa larval, la misma que es utilizada como fuente de alimento rico en proteínas ($40\pm 3.8\%$) y lípidos ($28\pm 8.6\%$) para animales de granja y peces (24). Además, poseen una particularidad debido a la microflora de su tracto digestivo, la cual no sólo juega roles importantes en la digestión de estos desechos sino también actúa como un sistema inmune y previene la colonización de patógenos por medio de la microbiota propia de su tracto digestivo (25, 26). Reportes anteriores mencionan que dichos microorganismos forman una relación antagónica con bacterias de la especie *Escherichia coli* en restos lácteos (3) y en guano de pollo (19).

3.2. Microflora intestinal de insectos

Desde hace varios años se ha comenzado a estudiar la relación existente entre microorganismos endosimbióticos y los animales (27-29). Demostrando que existe la presencia de bacterias y hongos en el tracto digestivo de ciertos insectos saprófagos que se alimentan de materia orgánica en descomposición; dichas micro comunidades son indispensables en transformación de ciertos alimentos para beneficio del huésped (30).

Los microorganismos asociados de manera simbiótica, degradan los compuestos que sus hospederos son incapaces de digerir, mostrando su papel importante en la digestión de la materia orgánica. Además, son considerados esenciales en el sostenimiento del suelo, en la fisiología de acogida y sobretodo en el sistema inmunológico de los insectos, teniendo un rol muy importante en el impedimento de la colonización de patógenos nocivos (25, 26, 31, 32).

La diversidad microbiana del tracto digestivo de los insectos es parcialmente dependiente de la dieta que consuman y hasta del estadio en el que se encuentren, tal y como se demuestra en el mismo ser humano. Las comunidades microbianas cambian y predominan las especies que son capaces de degradar los componentes de la dieta vigente (33).

Otra importancia resaltante es que la microflora intestinal de los insectos es una fuente importante en el aislamiento e identificación de nuevas especies fúngicas y bacterianas (29, 34, 35). Sin embargo, la información de la diversidad fúngica propia de esta especie aún no se encuentra reportada pero se cree que participan de una forma activa en el potencial antagonista contra bacterias patógenas.

3.3. Los insectos como posibles fuentes de antibióticos

Se ha reportado que diferentes insectos tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas que se originan en la superficie o dentro de su tracto digestivo para prevenir la infección microbiana (18-20). Estas investigaciones incluyen la especie *H. illucens* utilizada en la bioconversión de desechos y que genera sustancias antibacterianas para eliminar los patógenos presentes en estos sustratos (3, 4).

Un grupo muy prometedor de sustancias antibióticas son los péptidos microbianos (36). Su producción ha sido reportada en varios microorganismos, en donde su expresión puede ser constitutiva o inducida por la presencia de sustancias señal formadas por microorganismos acompañantes. En la naturaleza, diferentes microorganismos pueden competir por los sustratos, así como actuar de una manera simbiótica, por lo que algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para proteger sus sustratos y defender su hábitat contra los competidores (37); dicha interacción se puede simular al utilizarse el método del cocultivo *in vitro*.

3.4. Hongos

Microorganismos eucariotas, que presentan un núcleo rodeado por membrana y que contienen cromosomas; dentro de sus células presentan diversas organelas. Su ADN contiene intrones y sus ribosomas son del tipo 80S (7).

Su pared celular está compuesta por quitina y glucanos (polímeros de glucosa con enlaces β -1,3 and β -1,6), teniendo al ergosterol como el mayor esterol encontrado en sus membranas. Otra de sus características es que son heterótrofos, más específicamente quimio-organótrofos. Contienen en su mayoría un núcleo haploide;

sin embargo, existen algunas células hifales que pueden tener diversos núcleos en cada compartimento, o incluso algunas levaduras se presentan como diploides (7).

Su reproducción puede ser sexual o asexual produciendo esporas que son características de cada género ayudando a su clasificación taxonómica. Generalmente se desarrollan como filamentos llamados hifas que tienen crecimiento apical, es decir, que sólo crecen a partir del extremo de la hifa y que en su conjunto son llamados micelio (38).

3.4.1. Desarrollo morfológico

Pueden presentarse de diversas maneras ya sea como una única célula o como un grupo de ellas. Dividiéndose en:

3.4.1.1. Hongos levaduriformes

Hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión. Normalmente se las encuentran en situaciones donde no es necesario la penetración del sustrato colonizado. Pocas de sus especies son dimórficas; es decir, que pueden ser capaces de cambiar su morfología levaduriforme a un crecimiento parecido a una hifa (39).

Las levaduras tienen una amplia extensión ecológica, y se encuentran en ambientes naturales como cuerpos de agua, suelos, hasta incluso las podemos encontrar en la flora microbiana natural de los humanos, animales, insectos, plantas entre otros. La interacción que pueden presentar estos microorganismos incluye simbiosis, mutualismo, parasitismo y competencia (40).

3.4.1.2. Hongos filamentosos

Hongos pluricelulares que están compuestos por micelio o hifas que pueden o no ser septadas. Presentan también micelio aéreo donde se encuentran las estructuras reproductivas de diferentes formas y tamaños. La diferencia en la morfología de las estructuras reproductivas ayuda en la identificación del género fúngico. Este tipo de hongos pueden existir en diversas formas (Pleomórficos); la morfología que incluye la formación de esporas de manera sexual se le llama Teleomorfo, mientras que la forma en la que se producen esporas de manera asexual es llamada Anamorfa. En la antigüedad se les consideraba como hongos con estadios perfectos a aquellos que presentaban la reproducción sexual, mientras que los hongos con estadios imperfectos presentaban reproducción asexual (39).

3.4.2. Dimorfismo sexual

Aunque la mayoría de los hongos puedan desarrollarse como levaduras o como hongos filamentosos. Existen algunos de ellos que son capaces de crecer en ambas formas, dependiendo de las condiciones ambientales que se les presenten. Los hongos que pueden desarrollarse en cierto momento de su vida como hongos levaduriformes y en otros como hongos filamentosos se les llaman dimórficos. Normalmente pertenecen a hongos patógenos ya que la variabilidad en su morfología les permite abarcar diferentes ventajas de infección, sin embargo también pueden ser saprófitos o comensales (8).

3.4.3. Clasificación

Los hongos han sido clasificados en sus inicios de acuerdo a la morfología de sus esporas. Sin embargo, esto ha acarreado diversos problemas en su identificación taxonómica, puesto que un mismo hongo ha sido nombrado de múltiples maneras debido a sus características fenotípicas. Para disminuir este problema se ha iniciado la utilización de técnicas moleculares con las que se analiza las secuencias de ADN del hongo comparándolas con la secuencias de diversas bases de datos fúngicas (41).

En la actualidad se han reconocido la división de 6 filos a partir del Reino Fungi conocidos como: Filo Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota. Además, existen algunos hongos cuya data genética no encaja con ninguno de estos filos como por ejemplo los Zygomycota incluida en las anteriores clasificaciones como un filo independiente, y que por el momento se ha separado de esta nueva clasificación (42). En este caso se tomará en cuenta los filos más abundantes para su descripción.

3.4.3.1. Filo Ascomycota

Es la división de hongos más abundante, se cree que tienen más de 33 000 especies entre hongos clasificados y no clasificados. En este filo se encuentran no sólo levaduras sino también hongos filamentosos. Además, se encuentran los microorganismos que forman simbiosis ya sea con algas o cianobacterias formando líquenes; o en simbiosis con plantas (especies micorrízicas, saprofitas), incluso también como patógenos de plantas y animales.

Su reproducción puede ser asexual (anamorfos) produciendo esporas o conidias o también pueden reproducirse de manera sexual (Teleomorfo) a través de órganos sexuales llamados de manera general como “ascomas” que de acuerdo a su morfología se les da diferentes denominaciones (apotecios, peritecios o cleistotecios). Así mismo dentro de estos ascomas se encuentran unas células llamadas ascas, que son las productoras de las ascosporas (Figura 3) (42).

En este grupo se encuentran los Saccharomycetes como las levaduras del género *Candida*, *Pichia*, *Stephanoascus*, etc; los Eurotiomycetes como los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, etc (39).

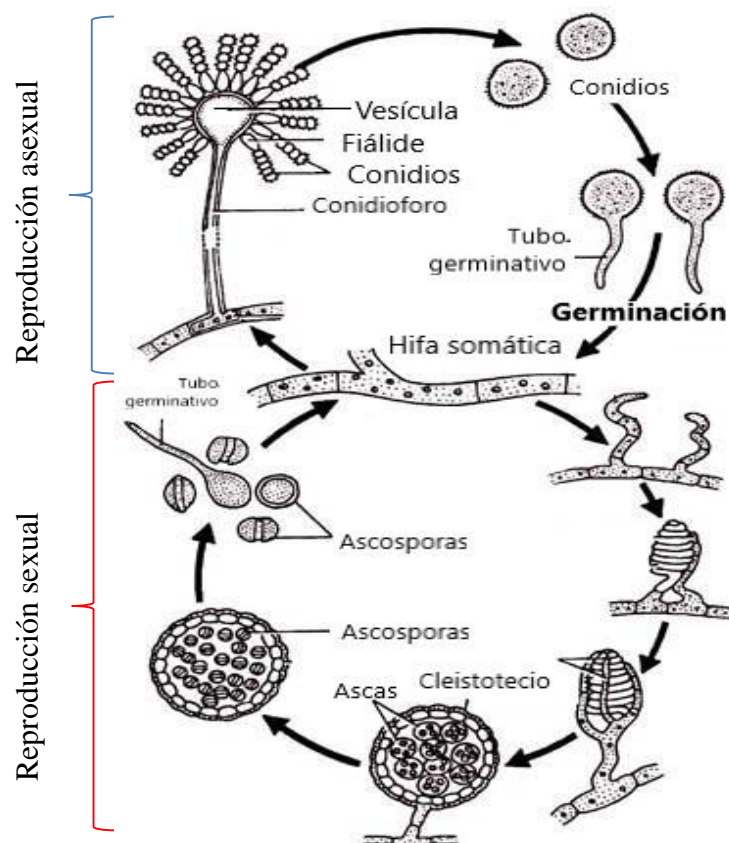


Figura 3: Reproducción sexual y asexual de un Ascomycota del género *Aspergillus*.

Fuente: modificado de http://cdn.biologydiscussion.com/wp-content/uploads/2016/02/clip_image015-34.jpg

3.4.3.2. Filo Basidiomycota

Es una de las divisiones más grandes y conocidas, que incluyen a más de 30 000 especies de hongos pertenecientes a diversos ambientes. Estos juegan roles importantes en la ecología, como por ejemplo los hongos que forman setas o macrohongos que pueden formar simbiosis con algunos árboles. Incluyen además hongos simbióticos de diversos insectos como termitas y hormigas siendo utilizados como su alimento. Por otro lado, en este grupo también se añaden hongos patógenos para plantas como las royas y los carbones. Incluso se pueden añadir algunas levaduras y otros hongos dimórficos como los Tremellomycetes. (39, 42)

Este filo se caracteriza por tener 3 características principales: producir esporas llamadas basidiosporas a partir de células llamadas basidios; presentar septos a través de sus estructuras hifales formando así compartimientos estructurales sucesivos; y presentar clamps o abrazaderas en las hifas (42).

Estos microorganismos generalmente producen basidiosporas que son esparcidas al ambiente, al germinar se inicia el crecimiento de las hifas las cuales son haploides. Posteriormente, al recombinarse otra hifa haploide compatible, se convierte en una hifa diploide la cual es capaz de formar un cuerpo fructífero que va a contener los basidios y las basidiosporas (Figura 4).

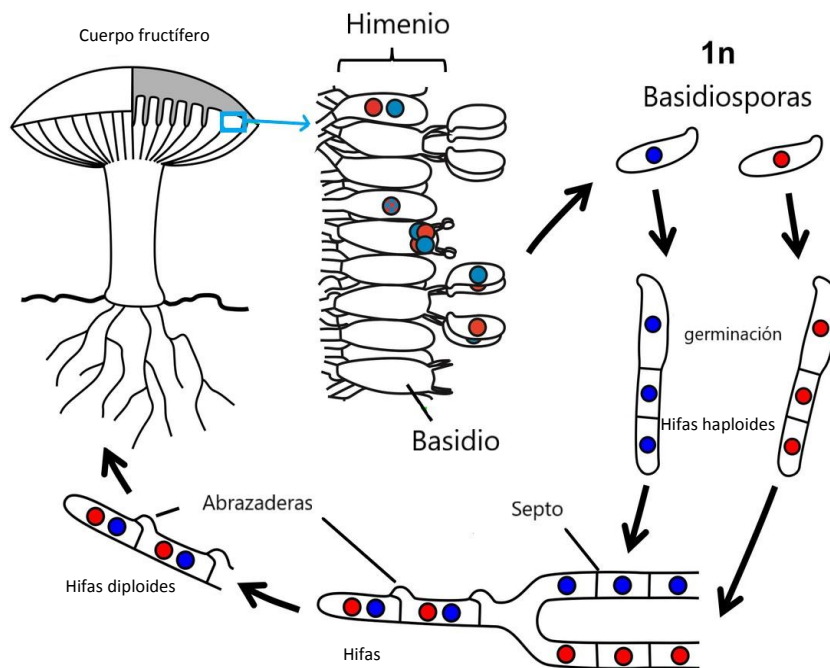


Figura 4: Ciclo de vida de un basidiomiceto del género *Agaricus*.

Fuente: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/03_02_09_life_cycle_of_Agaricus_sp.%2C_Agaricales_Basidiomycota_%28M._Piepenbring%29_nl_txt.png Modificado de

3.4.3.3. Otros Filos

Los filios Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota son menos abundantes que los anteriormente mencionados.

El filo Blastocladiomycota contiene alrededor de menos de 200 especies descritas, y se caracteriza por ser hongos acuáticos que presentan esporas flageladas llamadas zoosporas. Este filo también es caracterizado por producir colonias cortas con atrofia de hifas y por presentar rizoides en la base del hongo cuando se encuentran en un medio líquido. Por otro lado se ha encontrado que

en cultivos sólidos tienden a formar colonias ramificadas de hifas cenocíticas o sin tabicaciones (42).

El filo Chytridiomycota también son hongos acuáticos que producen zoosporas uniflageladas aeróbicas; sin embargo, no forman ningún tipo de micelio, lo que forman es un tipo de talo que dentro contiene cuerpos esferoidales multinucleados, y que en condiciones de niveles bajos de nutrientes se liberan como zoosporas (42).

El filo Glomeromycota es conocido por tener asociaciones micorrízicas con las plantas. Contienen unas estructuras llamadas arbusculos que les sirven para realizar la transferencia de nutrientes entre las plantas (42).

Por último el filo Neocallimastigomycota contiene tan sólo 20 especies descritas, caracterizadas por ser anaeróbicas del tracto digestivo de los herbívoros. Son fibrolíticas y sus zoosporas suelen ser uni o multiflagelares (42).

3.4.4. Hongos productores de antibióticos

En los años 80, los hongos se caracterizaron por ser los productores de metabolitos secundarios con más propiedades antimicrobianas. Los hongos junto con diversas especies de *Streptomyces* han sido los que prácticamente han producido todos los metabolitos bioactivos que conocemos. Ahora se sabe que los hongos son el segundo grupo microbiano con más producción de metabolitos, y entre ellos podemos mencionar a los basidiomicetos (macrohongos) y a los microhongos filamentosos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y otras especies) (1). Otro

grupo fúngico menos explorado son los microhongos levaduriformes que han sido reportados por la producción de “Yeast Killer toxins”(43). Estos compuestos tienen propiedades antagonistas contra levaduras de su misma especie, las mismas que son llamadas levaduras susceptibles.

3.5. Técnicas para detectar antagonismo entre microorganismos

Las técnicas de antagonismo para detectar actividad antimicrobiana normalmente se realizan en agares sólidos que permiten observar la inhibición de crecimiento de la cepa bacteriana patógena. Existen dos tipos de métodos, el enfrentamiento simultáneo (o directo) y la prueba diferida (44).

El enfrentamiento simultáneo consta de cultivar a dos tipos de microorganismos vivos de manera conjunta y en un mismo sistema; uno de ellos liberará moléculas que inhibirá el crecimiento del otro microorganismo. Estos métodos en simultáneo (o directos) han sido llamados también como métodos de cocultivo, y son considerados como una herramienta que incrementa la diversidad química de los productos secundarios provenientes de hongos o bacterias (45).

Existen variaciones de este procedimiento, el más conocido es la prueba del “Spot” o por punto; donde el microorganismo con presunta producción de moléculas antibióticas es inoculado en una gota en la superficie del agar que contiene al microorganismo a inhibir. Otra variación de los métodos directos incluye la técnica “agar slab” o agar en bloque que permite el crecimiento del microorganismo con presunta producción de moléculas en una porción de agar (cilindros pequeños) que estará en contacto con la superficie del agar inoculado con la bacteria a inhibir (44). A su vez, existe el método de “difusión en pozos” en donde se realizan pequeños

pocillos en una placa inoculada con la bacteria a inhibir, dentro de ellos se realiza el crecimiento en paralelo de microorganismos vivos con presunta actividad antimicrobiana.

Por otro lado, los procedimientos de antagonismo diferido prefieren trabajar sólo con los compuestos que liberan los microorganismos, más no con el organismo vivo y eliminan a la cepa productora de compuestos antes de enfrentar su cultivo con las bacterias a inhibir. Entre las técnicas pertenecientes a este grupo encontramos “test de discos de difusión” y “difusión en pozos” utilizando el medio de cultivo con el cual crecía el microorganismo. Si bien es cierto este método no genera interacción directa de los microorganismos, pero resultan ser más sensibles por no tener limitantes de tiempo y temperatura de incubación (46).

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las larvas de BSF vienen siendo utilizadas en la bioconversión de desechos orgánicos por su alta productividad (21, 22). Dichas larvas poseen una ventaja debido a la microflora de su tracto digestivo, la cual no sólo juega roles importantes en la digestión de estos desechos sino también sirve como sistema inmune y previene la colonización de patógenos (25, 26). Se ha reportado en algunos estudios la presencia de diversas especies de bacterias propias de su tracto digestivo; sin embargo, no existen publicaciones de las especies fúngicas que también estarían interactuando y produciendo diversos metabolitos favorables para el desarrollo del sistema inmune de esta larva. Y como es sabido, los hongos son uno de los mayores grupos productores de antibióticos (1, 7).

Por este motivo en este estudio se aisló e identificó hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de BSF que demuestren tener propiedades antimicrobianas contra alguna de las dos bacterias patógenas ATCC probadas. Los organismos fúngicos con actividades antimicrobianas tendrían una importancia relevante en la salud pública, ya que podrían ser utilizados como productores de futuros compuestos antimicrobianos para ayudar y enfrentar el problema de la resistencia microbiana. Además, esta investigación generó un reporte en la identificación de cepas fúngicas pertenecientes al tracto digestivo de *H. illucens* que hasta el momento no se ha obtenido.

5. HIPOTESIS

La microbiota fúngica del tracto digestivo de larvas de la mosca saprófaga *Hermetia illucens* posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. Typhimurium ATCC 13311.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Aislar e identificar hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de la mosca *H. illucens*, que demuestren tener actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. Typhimurium ATCC 13311.

6.2. Objetivos específicos

- Aislar hongos provenientes del tracto digestivo de las larvas de *H. illucens* utilizando técnicas convencionales de cultivo.
- Identificar por morfología y por técnicas moleculares a las distintas especies fúngicas presentes en el tracto digestivo de la larva de *H. illucens*.
- Enfrentar los organismos fúngicos aislados del tracto digestivo de la larva, contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. Typhimurium ATCC 13311.
- Evaluar la actividad antimicrobiana a partir del extracto crudo de acetato de etilo proveniente del cultivo del hongo con actividad promisorio.

7. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

7.1. Diseño de investigación

Este estudio posee un diseño descriptivo, experimental y prospectivo. La dimensión temporal es del tipo transversal ya que la colecta de datos se realizó en un solo corte en el tiempo o época.

El diseño experimental se ha dividido en 4 etapas (Figura 5); la primera de ellas inició en el aislamiento de cepas fúngicas de morfotipos diferentes a partir del tracto digestivo de larvas de *H. illucens*; para esta actividad se trabajó con dos poblaciones larvales de dietas diferentes (Alimento comercial para aves y Guano de gallina); las cepas obtenidas fueron preservadas a diferentes temperaturas y diferenciadas como hongos levaduriformes u hongos filamentosos.

En la segunda etapa, las cepas fúngicas de morfotipos diferentes fueron caracterizadas de manera macroscópica y microscópica; realizando una descripción detallada de cada una de ellas. A su vez cada cepa pasó por el proceso de identificación molecular, para tal fin se procedió a extraer el ADN y amplificar una porción del mismo que contenía los genes 18S, 5.8S y 28S así como también los ITS 1 y 2. Estas porciones fueron secuenciadas y analizadas por técnicas bioinformáticas para poder identificar la especie de cada hongo.

En la tercera etapa se realizaron las pruebas de antagonismo en donde se enfrentó cada una de las cepas aisladas del tracto digestivo de la larva contra dos cepas patógenas ATCC (*S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311), en esta etapa se buscó reconocer las cepas fúngicas que poseen actividad antimicrobiana contra alguna de las dos cepas patógenas anteriormente mencionadas. Finalmente

se eligió la cepa fúngica que tenía la mejor actividad antimicrobiana para ser trabajada en la cuarta etapa.

Por último en la cuarta etapa se cultivó la cepa fúngica promisoría en un medio líquido al cual posteriormente de la incubación se le realizó una extracción líquido-líquido con Acetato de etilo, evaluándose la actividad antimicrobiana de este extracto crudo por medio de bioautografía. A su vez se determinó el MIC y la mínima concentración media (IC50) de este extracto.

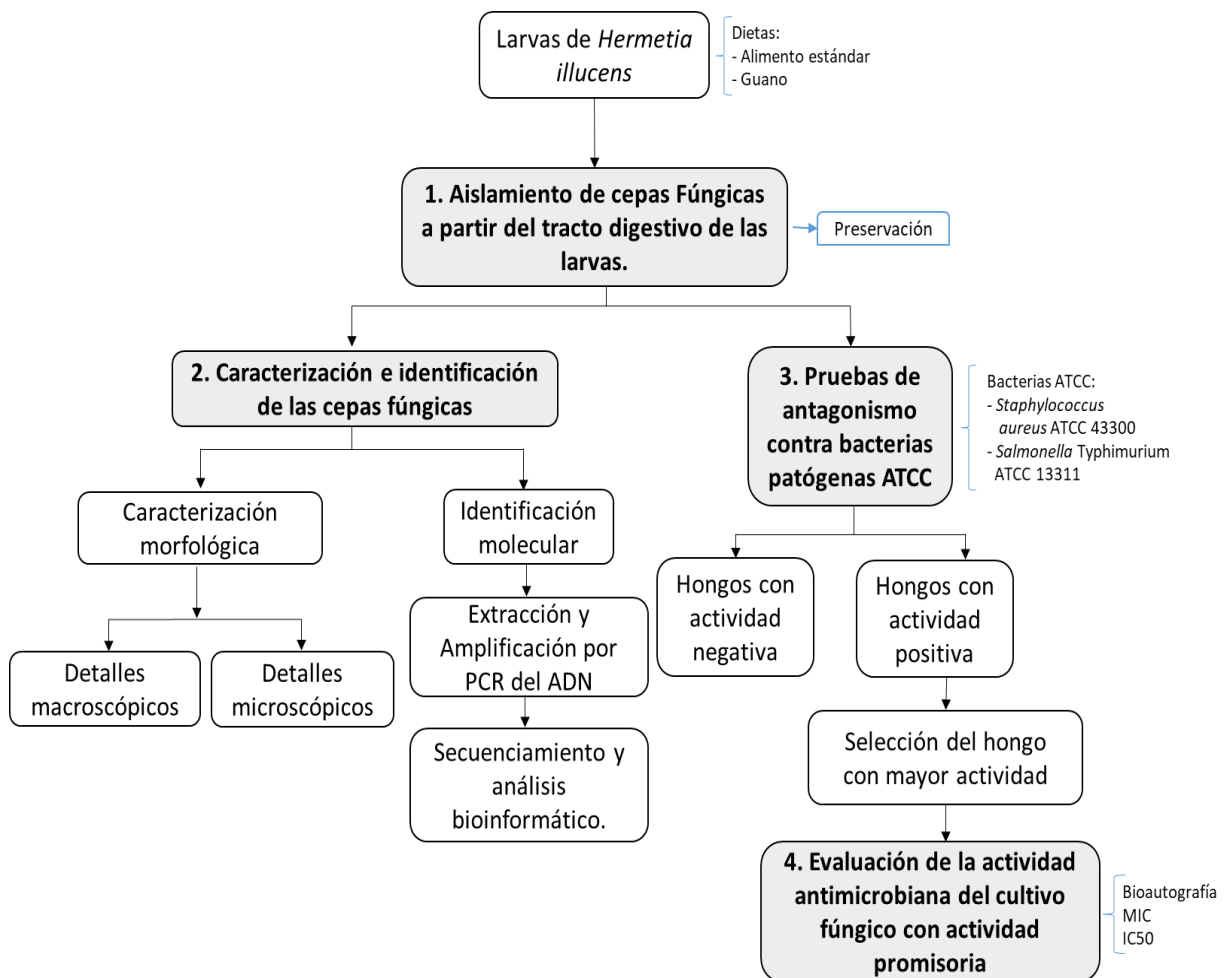


Figura 5: Esquema general de la metodología realizada.

Los enunciados mostrados en negrita son las 4 etapas principales en las que se dividió el presente estudio.

7.2. Población

El número de individuos necesarios para realizar un estudio de este tipo, dependió en primera instancia del objetivo del estudio y también del efecto de tamaño de la muestra, para esto se recomendó realizar estudios pilotos que ayudaron a tener una idea de la dimensión de la población dentro del tracto digestivo del individuo y de su variabilidad (47); además se sabe que las variaciones en el tracto intestinal de los seres vivos se debe a la divergencia en su alimentación.

En nuestro caso, la crianza estandarizada del insecto con un tipo de alimento, disminuye los factores que afectan en la variación de su microbiota. Para confirmar este enunciado se han realizado estudios pilotos en el laboratorio, que muestran baja variabilidad de morfotipos de hongos dentro del tracto digestivo de diferentes larvas de *H. illucens* cuando son alimentadas bajo las mismas condiciones y con un mismo tipo de alimento. Por lo cual se ha visto conveniente que el “n” muestral colectado para realizar el aislamiento de cepas fúngicas fuese de 10 individuos en cada uno de los experimentos de alimentación. Además, se realizó 3 repeticiones de aislamiento con el mismo número de larvas colectadas.

7.3. Muestras biológicas

7.3.1. Larvas del insecto

Se utilizó larvas de *Hermetia illucens* en el proceso de aislamiento de hongos a partir de su tracto digestivo. Para esto, las larvas contaban con un tamaño de 1.5-2 cm con 11 días de vida, alimentadas con 2 tipos de alimentos. La primera población fue alimentada con un alimento comercial de engorde para aves

(Puricarne®: 16.5% de proteínas, 3% de grasa, 6% de fibra, 14% de humedad y 10% de ceniza) al que nosotros llamamos Alimento comercial para aves (GS) y fue utilizada como control de alimentación. La segunda población de larvas fue alimentada con Guano de gallina (GU) no esterilizado durante todos los 11 días de crecimiento.

7.3.2. Cepas bacterianas ATCC

Se utilizó dos cepas bacterianas ATCC patógenas para realizar el enfrentamiento contra los hongos aislados del tracto digestivo de la larva. Ambas cepas bacterianas fueron utilizadas en el 6to pasaje en todos los experimentos realizados, incluso en sus repeticiones. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y otra Gram negativa.

La cepa Gram positiva fue representada por *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 caracterizada por ser una bacteria meticilino resistente (MRSA) y que de ahora en adelante se le abreviará como *S. aureus* ATCC 43300.

Por otro lado la cepa bacteriana Gram negativa fue representada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 y que de ahora en adelante se le abreviará como *S. Typhimurium* ATCC 13311.

7.4. Procedimientos y técnicas

7.4.1. Crianza y selección de larvas de *H. illucens*.

La crianza del ciclo biológico completo de *H. illucens* se realizó según el protocolo manejado en el laboratorio LMI-LAVI UPCH-IRD a temperaturas de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ a 70% de humedad relativa para los insectos adultos con un período de

luz de 12:12 horas y con una producción de larvas continuas alimentadas con dos tipos de comida.

Se utilizó 2 poblaciones de larvas de *H. illucens* en donde cada población fue alimentada con dietas diferentes, la dieta GS llamada Alimento comercial para aves consistió en un alimento comercial de engorde para pollos (Puricarne®) que no contenía ningún tipo de residuo orgánico contaminante; y la dieta GU la cual constó de guano de gallina.

Posteriormente se efectuó la selección de 10 larvas de *H. illucens* por cada dieta con 11 días de vida de 1.5-2 cm de longitud. La colecta de larvas se efectuó en tres ocasiones para obtener las repeticiones biológicas necesarias. Dichas larvas fueron utilizadas para los experimentos de extracción del tubo digestivo y el posterior aislamiento de hongos.

7.4.2. Aislamiento de cepas fúngicas a partir del intestino de *H. illucens*

7.4.2.1. Extracción del tubo digestivo de larvas de *H. illucens*.

Como primera instancia, las 10 larvas seleccionadas en cada muestreo fueron desinfectadas con alcohol al 70%, manteniéndose a 4°C para su transporte, y posteriormente fueron esterilizadas con radiación UV por 15 minutos. Este proceso fue realizado para descartar cualquier microorganismo proveniente de la superficie de la larva que pudiera alterar los resultados de aislamiento.

Pasado este tiempo se disectó cada una de las larvas de manera longitudinal desde la zona central al extremo caudal utilizando bisturís estériles, y se extrajo sus tubos digestivos. Se seleccionó un porción del intestino medio (Figura 6) que

presentaba contenido interno y se cortó 0.5 cm del mismo. Las porciones de 10 tractos digestivos larvales fueron utilizados en conjunto (pool) para el aislamiento de hongos.

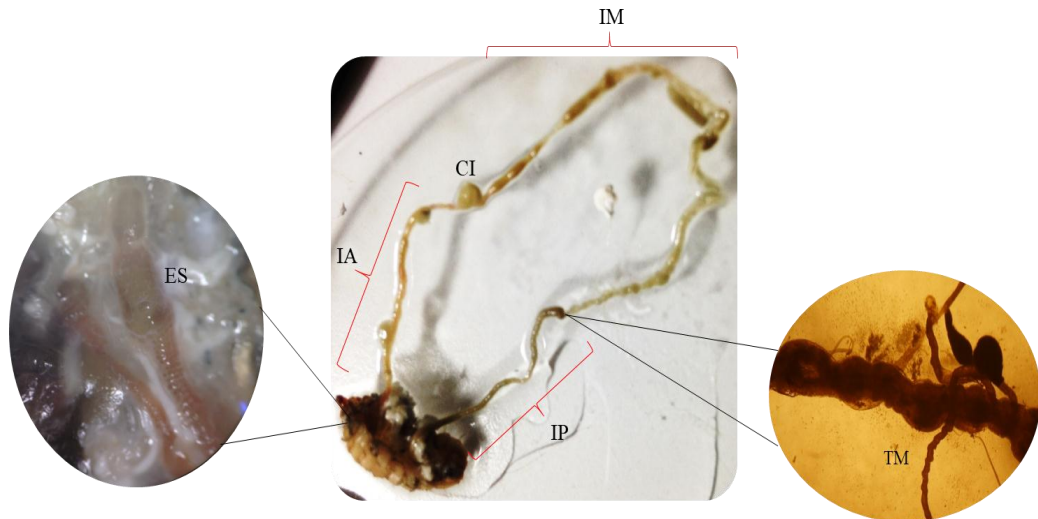


Figura 6: Fisiología del tracto digestivo de larvas de *H. illucens*.
IA: Intestino anterior; IM: Intestino medio; IP: Intestino posterior; ES: esófago; CI: Ciegos intestinales; TM: Tubos de Malpighi. ©LMI-LAVI

7.4.2.2. Aislamiento de cepas fúngicas

Las muestras de 10 tractos digestivos de larvas de *H. illucens* fueron homogenizadas en 200 μ L de solución salina estéril 0.89% (pool). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril (10^{-1} - 10^{-4}) y se utilizó 10 μ L por triplicado de cada dilución para ser sembrados con la técnica de extensión en placa en Agar Papa Dextrosa o APD (BD-Difco) y en Agar Sabouraud o ASB (BD-Difco) ambos suplementados con los antibióticos Cloranfenicol (100 mg/L) y Gentamicina (50 mg/L).

Se utilizaron dos controles para corroborar el aislamiento de hongos propios del tracto digestivo y descartar el aislamiento de algún tipo de contaminación

externa; un control negativo utilizando el diluyente (solución salina estéril) y otro control negativo a partir del hisopado de la superficie de las larvas en el proceso posterior a la desinfección y previo a la disección. Las placas sembradas con las diluciones de las muestras fueron incubadas por un lapso de 21 días a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, verificando constantemente si existe la aparición de colonias levaduriformes o filamentosas de morfotipos diferentes.

Las cepas con morfología diferente fueron repicadas por separado y de manera constante en los mismos agares para obtener colonias puras.

El objetivo principal de esta actividad fue el aislamiento de diversas cepas fúngicas con morfotipos diferentes a partir de larvas alimentadas con dietas diferentes (GS y GU), pudiendo obtener así una colección de cepas fúngicas con un posible potencial antibacteriano.

7.4.2.3. Preservación y recuperación de los hongos

Previamente a la preservación, cada cepa pura fue cultivada de acuerdo a su tipo y condiciones de crecimiento para obtener una biomasa óptima. Las cepas fúngicas levaduriformes fueron incubadas por un período de 48 horas a 30°C en ASB (BD-Difco); mientras que las cepas fúngicas filamentosas fueron incubadas por un período de 5 días a 30°C en el mismo agar hasta obtener esporas maduras.

La preservación es un paso importante en el correcto almacenaje de cepas fúngicas, por lo cual se unió tres grupos (por triplicado) preservados en temperaturas y medios de cultivo diferentes para garantizar su almacenamiento. El primer lote fue preservado a 4°C utilizando crioviales con 1 mL de agua destilada estéril en donde se colocó una asada del cultivo de la cepa; el segundo

lote fue preservado a -20°C utilizando crioviales con 1 mL de caldo leche inoculados con la cepa y por último un tercer lote fue preservado a -70°C utilizando crioviales con 1 mL de caldo extracto de levadura peptona dextrosa (YEPD) con 40% de glicerol inoculados con la cepa.

Para la recuperación de los hongos preservados, se descongelaron los viales en baño maría a 37°C por 5 minutos hasta que se observó la descongelación de los medios de cultivo, los mismos que fueron sembrados en ASB incubados a 30°C por el lapso de tiempo necesario de acuerdo al tipo de hongo.

7.4.3. Caracterización morfológica e identificación molecular de las cepas fúngicas

7.4.3.1. Caracterización morfológica

Las variables de la caracterización de cepas fúngicas fueron descritas de manera cualitativa teniendo en cuenta la morfología de manera macroscópica y microscópica, dicha información fue recopilada en un documento de Excel en el que se describió las características propias de cada cepa bajo los parámetros detallados a continuación:

7.4.3.1.1. Caracterización macroscópica

Se realizó un cuadro descriptivo de cada cepa fúngica aislada, describiendo la forma, la elevación, la textura, el aspecto, la superficie de la colonia, el color, los márgenes y la presencia o ausencia de pigmentos.

7.4.3.1.2. Caracterización microscópica

Para observar la morfología microscópica de cada cepa fúngica, se realizó el método de microcultivo o también llamado técnica de Riddell (48). Este método se basa en el cultivo del hongo en un sistema de ASB en bloques pequeños de 1 x 1 cm inoculado en las cuatro aristas del cubo; cuya base se encuentra sobre un portaobjetos y cuya superficie se encuentra bajo un cubreobjetos. La incubación fue a 30°C por un período de 48 horas (levaduras) o de 5 a 7 días (filamentosos) dependiendo del tipo y crecimiento de cada cepa. Esta técnica permitió el crecimiento del hongo en el mismo cubreobjeto y portaobjeto sin deteriorar las estructuras reproductivas que se formaban, facilitando así su posterior fijación con azul de lactofenol (Merck®) y su visualización al microscopio. Además, nos permitió realizar una presunta identificación del género al que pertenece.

La caracterización microscópica de los hongos levaduriformes tuvo en cuenta la descripción del tipo de blastospora y la formación o no de pseudohifas.

Por otro lado la caracterización microscópica de los hongos filamentosos tuvo en cuenta la descripción del tipo de hifa (septada o cenocítica) y la presencia o no de pigmento en ella (hialina o dermatiacea); el tipo de estructura reproductiva, el tipo de espora y la presencia de estructuras extras que ayudaron a su identificación presuntiva utilizando diferentes claves taxonómicas (49-51).

7.4.3.2. Identificación molecular de las especies de hongos aislados del intestino de *H. illucens*.

7.4.3.2.1. Extracción del ADN fúngico

Se realizó la extracción de ADN fúngico utilizando variantes de la metodología del fenol-cloroformo de acuerdo al tipo de hongo a utilizar, para esto se utilizó los cultivos puros de hongos previamente caracterizados de manera macroscópica y microscópica.

Para el caso de las cepas levaduriformes, se colectó biomasa de cada cepa en tubos de 1.5 mL con 500 µL de buffer TE o de lisis (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8) y con perlas de vidrio de 2 mm (Sigma®). A las muestras se les añadió 50 µL de lisozima (100 mg/mL), las cuales fueron incubadas a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se le agregó 75µL de SDS 10%, y 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Ambiom®) incubándolo a 65°C por 3 horas, las muestras fueron agitadas en vortex cada 30 min por un lapso de 1 minuto. Transcurrido el tiempo se añadió 100 µL de NaCl 5M y 100µL CTAB/NaCl (previamente calentado a 65°C), las muestras fueron agitadas e incubadas durante 10 minutos a 65°C. A continuación, se le adicionó 750 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al cual se adicionó 750 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se le añadió 1mL de alcohol absoluto frío colocándolo a -70°C por 15 minutos. La muestra fue centrifugada a 10,000 rpm por 8 minutos. El pellet obtenido fue

tratado con 1mL de alcohol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue puesto a secar a temperatura ambiente. La elución del pellet se realizó con 100 µL de buffer TE y se conservó el ADN a -20°C hasta su utilización.

En el caso de las cepas filamentosas, se inició con la transferencia de micelio y esporas de cada cepa a un tubo de 1.5 ml para ser almacenado a -20°C por 24 horas. Posteriormente se añadió 500 µL de buffer de lisis (5 mg/mL de Sodio Dodecil Sulfato; 14 mg/mL NaCl; 7.3 mg/mL EDTA, 200 µL/mL Tris-HCl 1M, pH 8), 5 µL de 2-mercaptoetanol y perlas de vidrio de 2 mm, las cuales fueron homogenizados antes y durante la incubación a 65°C por 1 hora, en períodos de 1 minuto cada 15 minutos. A continuación se le adicionó 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó durante 2 minutos hasta obtener una suspensión homogénea, posteriormente se centrifugó a 3400 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al cual se le añadió 500 µL de isopropanol a 4°C, se dejó reposar a -20°C por una noche y luego se centrifugó a 3400 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó con 1 mL de etanol frío (4°C) al 70% y se centrifugó nuevamente a 3400 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue nuevamente descartado y el pellet fue puesto a secar a temperatura ambiente. Por último, la elución del pellet se realizó con 100µL de agua estéril para PCR y se efectuó una electroforesis para verificar la integridad del ADN en gel de agarosa. El ADN extraído fue almacenado a -20°C en agua para PCR hasta su utilización.

7.4.3.2.2. Verificación de integridad de ADN genómico mediante electroforesis

Posteriormente a la extracción del ADN fúngico se realizó una electroforesis para verificar la integridad del ADN en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (40mM acetato de Tris, 2mM EDTA, pH 8.5). Las muestras fueron incorporadas en diferentes proporciones (1/5, 1/20 y 1/50 así como también se utilizó la muestra sin diluir). Asimismo, se utilizó el marcador de peso molecular y el marcador fago lambda (10 ng/ μ L) para realizar la cuantificación de la muestra de ADN fúngico. La corrida electroforética se realizó a 80V durante 40 minutos y el gel fue revelado utilizando bromuro de etidio para visualizar las bandas con el respectivo peso molecular.

7.4.3.2.3. Amplificación de ADN fúngico

Se procedió a realizar la amplificación de ADN fúngico por PCR convencional utilizando los cebadores universales NS5-F (AACTTAAAGGAATTGACGGAAG) (52) e ITS4-R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (52) que abarca parte de los genes 18S y 28S; el total del gen 5.8S; y las secuencias intergénicas 1 y 2, tal y como se muestra en la Figura 7. Para esto se preparó un mix de reacción de 48 μ L conteniendo 1X de Buffer HF, 800 μ M de deoxinucleótidos trifosfatados, 0.5 μ M del cebador NS5-F y 0.5 μ M del cebador ITS4-R, así mismo se utilizó 1.5 μ L de DMSO y 1 U de polimerasa PHF. El ADN fue incluido en 2 μ L en la concentración necesaria para realizar un PCR.

Las condiciones de ciclado estuvieron conformadas por una denaturación inicial a 98°C por 30 segundos, seguido por 30 ciclos de denaturación a 98°C por 10 segundos, hibridación a 62°C por 30 segundos, y extensión a 62°C por 45 segundos, finalmente se concluyó con una extensión final a 72°C por 10 segundos.

Así mismo se verificó el producto de PCR realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (40mM acetato de Tris, 2mM EDTA, pH 8.5), utilizándose un marcador de peso molecular y el marcador fago lambda (10 ng/μL). La corrida electroforética se realizó a 80V durante 40 minutos y el gel fue revelado utilizando bromuro de etidio para visualizar las bandas con el respectivo peso molecular.

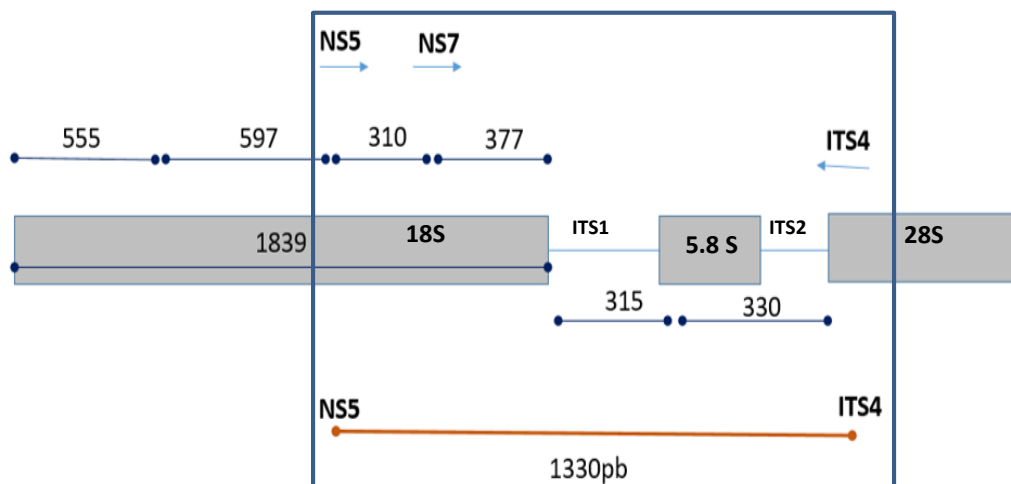


Figura 7: Esquema de cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de genes ribosomales fúngicos.

Las flechas celestes indican la localización de cada cebador mientras que la línea naranja muestra el lugar y el tamaño aproximado que se utilizó para la amplificación del gen fúngico.

7.4.3.2.4. Secuenciamiento y análisis bioinformático del ADN fúngico

La identificación de los hongos aislados del tracto digestivo de *H. illucens* se realizó en base al secuenciamiento de los genes 18S, 28S y el total del gen 5.8S además de las secuencias intergénicas 1 y 2 (Figura 7). Se utilizó los cebadores NS5-F (AACTTAAAGGAATTGACGGAAG)(52) e ITS4-R (TCCTCCGCTTATTGATATGC)(52) en el proceso de amplificación de ADN, así como también se añadió el cebador interno NS7 (GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC)(52) en el proceso de secuenciamiento. Este procedimiento fue realizado por el servicio de secuenciamiento de la empresa Macrogen USA, el cual utiliza un sistema automatizado de secuenciamiento estándar en base a la metodología de Sanger.

Las secuencias de ADN de cada hongo fueron analizadas utilizando el programa MEGA7. Este programa ayudó a procesar y ensamblar los 3 resultados de secuenciamiento de cada hongo para generar un consenso o contig. Posteriormente se utilizó la herramienta Nucleotide BLAST en el NCBI, esta herramienta realiza alineamientos locales de las secuencias, y consulta con una base de datos en línea para encontrar secuencias similares y sugerir así el nombre de la especie con mayor homología. Es así como se logró obtener la identificación taxonómica de cada una de las cepas fúngicas.

7.4.4. Pruebas de antagonismo de hongos contra bacterias patógenas

Se realizó diferentes técnicas de antagonismo (por triplicado) de acuerdo al tipo de hongo a enfrentar; es decir, dependiendo si el hongo es levaduriforme o filamentoso (Figura 8). A su vez se usó tetraciclina como control positivo contra las bacterias patógenas de acuerdo a cada una de las metodologías.

La finalidad de esta prueba fue reconocer a las cepas fúngicas que producen compuestos antibióticos y seleccionar una cepa fúngica que presente una actividad antimicrobiana prometedora y que brinde de un estudio novedoso en la producción de compuestos activos, es decir que haya sido poco estudiado.

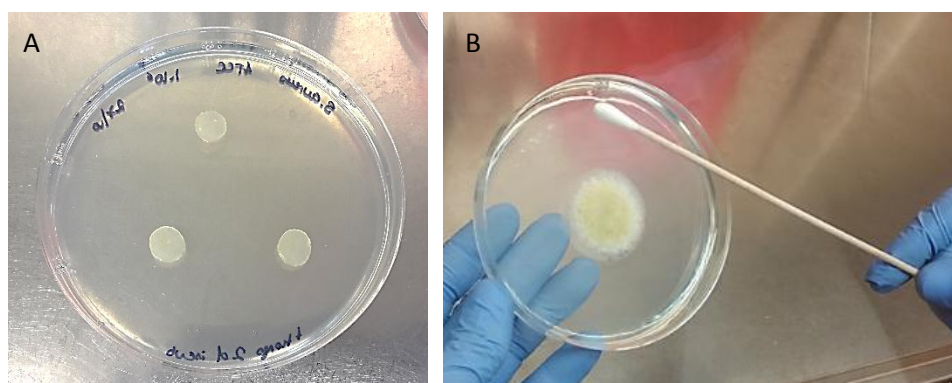


Figura 8: Pruebas de antagonismo entre hongos y bacterias patógenas.
A: Método de agar en bloque para levaduras. Los tres círculos pequeños son los bloques de ASB que contienen levaduras situadas encima de AN con incorporación de bacterias ATCC. B: Método de antagonismo para hongos filamentosos. En el centro se visualiza el crecimiento del hongo filamentoso, mientras que con la ayuda de un hisopo se inocula la bacteria alrededor de él.

7.4.4.1. Pruebas de antagonismo para hongos levaduriformes

Las cepas fúngicas levaduriformes aisladas del tracto digestivo de la mosca fueron enfrentadas contra los agentes bacterianos patógenos a través del método “Agar en bloque” (53) modificado (Figura 8A). Para ello, suspensiones

de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL fueron inoculadas individualmente por incorporación en placa en 15 mL de Agar nutritivo (AN), para posteriormente ser enfrentadas contra las levaduras de interés.

Las levaduras aisladas del intestino de la mosca fueron previamente sembradas por incorporación en placa en 15 mL ASB con una concentración de 1×10^6 UFC/mL e incubadas a 30°C por 24 horas. Posteriormente se cortó segmentos circulares del cultivo de levaduras que fueron colocados sobre el agar cultivado recientemente con la bacteria patógena ATCC. El enfrentamiento se incubó por 24 horas a 30°C, luego de este tiempo se procedió a detectar la presencia de zonas de inhibición. Todas las pruebas de antagonismo utilizando el método “agar en bloque” se realizaron por triplicado para cada uno de los experimentos.

El efecto antagonista positivo se detectó por la inhibición de crecimiento de la cepa bacteriana patógena alrededor del círculo de cultivo de la levadura. El diámetro de dicha inhibición fue medido en su totalidad para poder comparar el efecto antagonista de cada cepa positiva. Así mismo, el parámetro cuantitativo a detectar fue representado por el potencial antimicrobiano (PA) de cada cepa (54), el cual se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$PA = \frac{DI}{DH}$$

Donde DI es el diámetro del halo de inhibición y DH es el diámetro del crecimiento fúngico (DH) (Figura 9). Los hongos con actividad antimicrobiana

presentaron valores mayores a la unidad, mientras que los hongos sin actividad antimicrobiana presentaron valores iguales a la unidad.

Los controles positivos para medir la reproducibilidad y el correcto desarrollo de los experimentos fueron realizados de acuerdo a la técnica anteriormente descrita utilizando cilindros de agar que contenían el antibiótico tetraciclina (30 µg). Para esto se preparó una placa petri con 22,5 µg/mL del antibiótico homogenizado en 15 mL de ASB, se dejó solidificar y se cortó cilindros de 8 mm de diámetro los cuales fueron utilizados como los controles positivos.

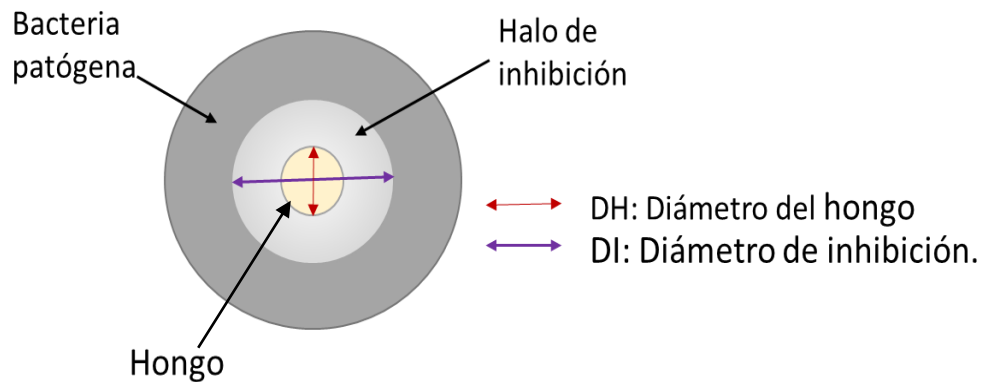


Figura 9: Representación gráfica del antagonismo esperado en el enfrentamiento fúngico contra la bacteria patógena seleccionada. Las flechas roja y morada muestran las mediciones que se realizaron para obtener el potencial antimicrobiano.

7.4.4.2. Pruebas de antagonismo para hongos filamentosos

Las cepas fúngicas filamentosas aisladas del tracto digestivo de la mosca fueron enfrentadas contra la cepa bacteriana Gram positiva *S. aureus* ATCC 43300, y la cepa bacteriana Gram negativa *S. Typhimurium* ATCC 13311.

Para ello, se realizó el cultivo del hongo filamentoso en una placa de APD incubándola por 3-5 días a 30°C. Posteriormente se realizó la colecta de las esporas, las mismas que fueron cuantificadas y llevadas a una concentración de 1×10^3 esporas/mL. Posteriormente se inoculó 10 μ L de esta concentración en un pozo en medio de una placa de ASB, la cual se incubó por 6 días a 30°C. A continuación, se inoculó las bacterias patógenas alrededor del hongo utilizando un hisopo estéril a una concentración de 1×10^6 UFC/ml (Figura 8B). Las pruebas de antagonismo utilizando el método de cocultivo se realizaron por triplicado para cada una de las cepas.

El parámetro cualitativo detectado fue el efecto antagonista positivo que se observó por la inhibición del crecimiento de la cepa bacteriana patógena alrededor del crecimiento fúngico filamentoso dentro de las 24 horas de incubación en cocultivo. Así mismo, el parámetro cuantitativo detectado fue representado por el potencial antimicrobiano (PA) de cada cepa (54), el cual se obtiene a partir de la proporción entre el diámetro del halo de inhibición (DI) / diámetro del crecimiento fúngico filamentoso (DH). Los hongos con actividad antimicrobiana presentaron valores mayores a la unidad, mientras que los hongos sin actividad antimicrobiana presentaron valores iguales a la unidad.

Para medir la reproducibilidad de la técnica y el correcto desarrollo de la misma, se utilizó el antibiótico tetraciclina como control positivo (30 μ g) inoculados en el centro de la placa.

7.4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana a partir del extracto crudo de acetato de etilo proveniente del cultivo puro del hongo con actividad promisorio.

Se inició con el cultivo en caldo del hongo con actividad promisorio, luego de su crecimiento se separó la biomasa fúngica y el residuo acuoso del medio en el que se desarrolló. Se seleccionó el residuo acuoso para realizar una separación líquido-líquido con Acetato de etilo en proporción 1:1 del cual se obtuvo 2 fases (orgánica y acuosa). La fase orgánica confirmó su actividad antimicrobiana por bioautografía, además se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la concentración inhibitoria de la mitad de la población (IC50).

7.4.5.1. Cultivo líquido del hongo

Se utilizó el hongo seleccionado en el punto anterior, inoculándose una concentración de 1×10^5 esporas/mL en 50 mL de Caldo Sabouraud o CSB (BD-Difco) y se incubó a 30°C por un lapso de 2 días a 150 rpm en una incubadora orbital con agitación (Benchtop TOU-120), esta primera fermentación líquida ayudó a incrementar la biomasa del hongo y fue considerada como un pre-cultivo. Posteriormente se repartió la mitad del volumen obtenido en este pre-cultivo en dos matraces que contienen cada uno 500 mL de CSB y se incubó por 3 días a 30°C a 150 rpm (Figura 10A). Pasado este tiempo se procedió a realizar la partición líquido-líquido según el protocolo detallado más adelante.

Además, se utilizó un control negativo de crecimiento fúngico, donde realizó el procedimiento anterior sin inoculación del hongo. Con este control se pudo verificar la esterilidad del medio de cultivo en todo el proceso de incubación.

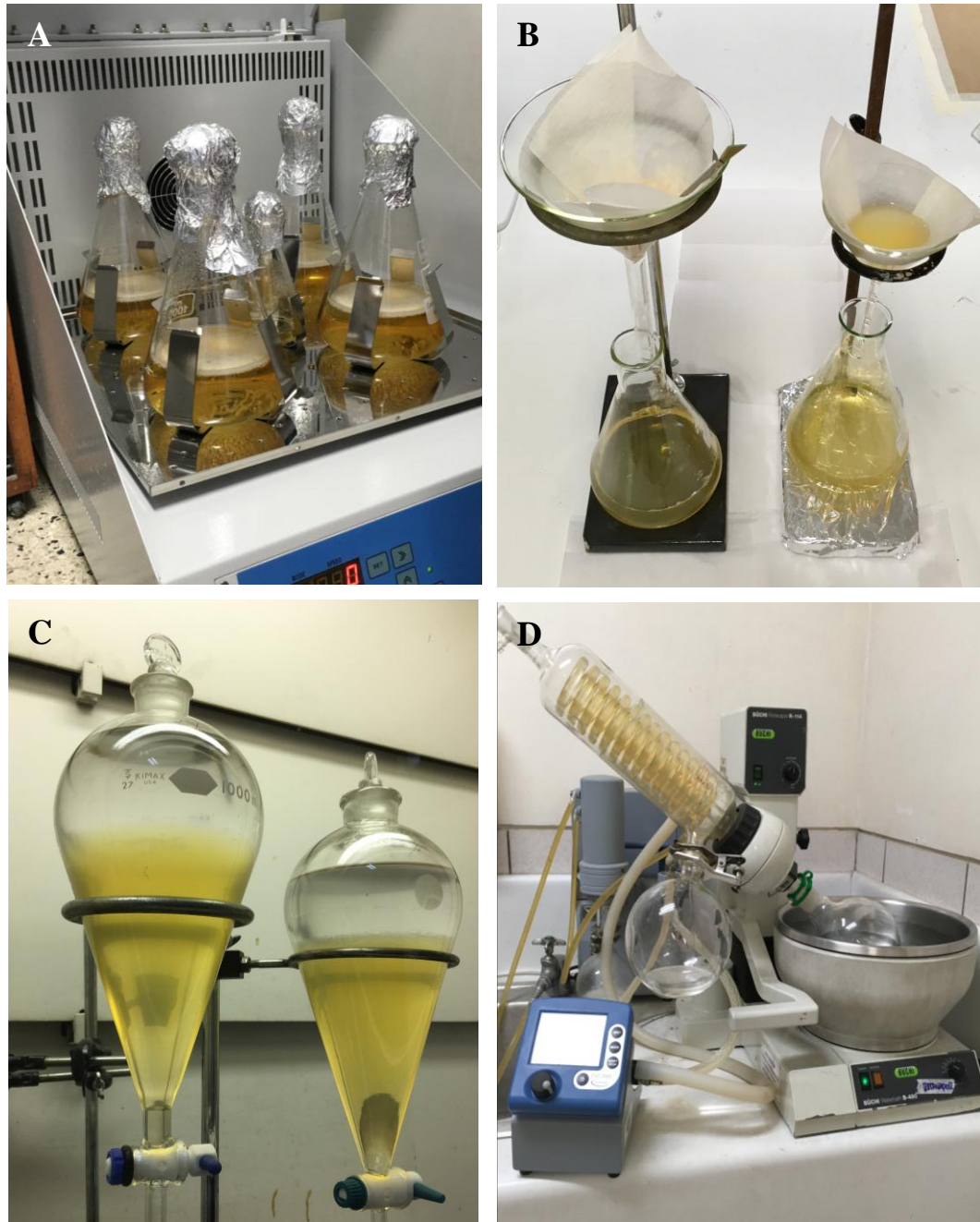


Figura 10: Proceso de producción del extracto crudo del hongo activo. Proceso de cultivo líquido del hongo (A), Filtración del cultivo del hongo (B), Partición líquido-líquido del sobrenadante del cultivo (C) y evaporación por presión reducida del extracto (D).

7.4.5.2. Partición Líquido-Líquido (55)

Se llevó a cabo la separación del micelio y el cultivo líquido utilizando filtración por gravedad con papel Whatman N° 93 (Figura 10B). Cada 500 mL del filtrado obtenido se llevó a partición líquida-líquida con 500 mL de Acetato de Etilo grado HPLC (J.T. Baker®); utilizando un embudo de separación (Figura 10C). Se separó la fase orgánica y se llevó a sequedad utilizando presión reducida (Rota-evaporador Büchi R-200, Figura 10D). Finalmente se determinó el rendimiento de la extracción con acetato de etilo por cada litro del cultivo líquido del hongo seleccionado reportando el peso del compuesto en miligramos.

Posteriormente se realizó diferentes técnicas para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto contra los patógenos bacterianos elegidos; la detección de actividad antimicrobiana se realizó de manera cualitativa utilizando la técnica de la bioautografía, así como también se utilizó la técnica de microdilución en caldo para determinar el IC50 y el MIC del extracto crudo.

7.4.5.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

7.4.5.3.1. Técnica de la bioautografía.

La técnica de la bioautografía permitió la detección cualitativa del compuesto antimicrobiano aún en matrices complejas como lo es un extracto. En este caso, se utilizó la técnica basada en la bioautografía con capa de agar o bioautografía de inmersión (56) realizada de dos maneras. La primera fue una bioautografía por punto y la segunda una bioautografía con corrida de solventes.

Para la metodología de bioautografía por punto se preparó placas de TLC de Silica Gel 60°A (Merck®) con soporte de aluminio e indicador de fluorescencia F₂₅₄ de 8 cm largo x 3 cm de ancho. Se aplicó 5 µL, 10 µL y 15 µL de una solución de 20 µg/µL del extracto de acetato de etilo, para tener una concentración final de 100, 200 y 300 µg respectivamente. A continuación, se esterilizó la placa bajo UV durante 15 minutos y dispensó sobre ella 5 mL de Agar Nutritivo (BD-Difco) a 45°C inoculado previamente con cada una de las bacterias patógenas ATCC anteriormente mencionadas en una concentración de 1×10^6 UFC/mL, se esperó a que el agar se solidificara sobre el TLC para posteriormente incubarlo a 37°C por 24 horas y revelar el crecimiento bacteriano.

Para la metodología de bioautografía con corrida de solventes se preparó 2 placas de TLC por cada ensayo, con 8 cm largo x 3 cm de ancho. Se aplicó 5 µL de una solución de 20 µg/µL del extracto de acetato de etilo sobre la línea base de la placa de TLC iniciando su corrida en una fase móvil de diclorometano: metanol (9.5:0.5), posteriormente una de las placas de TLC fue utilizada como control y fue revelada mediante luz UV (366 nm y 254 nm), mientras que la otra fue utilizada para realizar la bioautografía. A continuación, se dispensó sobre ella 5 mL de Agar Nutritivo a 45°C inoculado previamente con una de las bacterias patógenas seleccionadas en una concentración de 1×10^6 UFC/mL, se esperó a que el agar enfriara y solidificara sobre el TLC para posteriormente incubarlo a 37°C por 24 horas y revelar el crecimiento bacteriano.

Es importante recalcar que se realizó controles positivos de actividad antimicrobiana así como también controles positivos y negativos de crecimiento bacteriano. Para realizar el control positivo de la actividad antimicrobiana se inoculó 5 μL de una solución stock de Tetraciclina a 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ disuelto en metanol, inoculado en un único punto dentro de cada placa de TLC; posteriormente se procedió a realizar el mismo procedimiento del protocolo anteriormente descrito para inocular las bacterias patógenas ATCC sobre la placa de TLC. Para el control positivo de crecimiento bacteriano se procedió a pasar una placa de TLC por el proceso de solventes o fase móvil sin la inoculación del extracto, posteriormente se vertió el agar con bacterias patógenas sobre la placa de TLC tal y cual se detalla anteriormente. Por otro lado, el control negativo de crecimiento bacteriano se realizó de la misma manera sin embargo el agar vertido sobre la placa no contenía inoculación bacteriana.

Para realizar el revelado del crecimiento bacteriano se preparó MTT a 5 mg/mL en PBS 1X; y se añadió 200 μL de dicha solución sobre la superficie del agar inoculado en el TLC. Se incubó por 3 horas hasta observar una coloración azul que significó la presencia y crecimiento de bacterias, mientras que un color amarillo representó la inhibición del crecimiento bacteriano por parte del extracto.

Se verificó la actividad antimicrobiana del extracto a partir de la presencia o ausencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Para el caso de la bioautografía por punto se reportó el diámetro de dicho halo, mientras que en el caso de la bioautografía por corrida de solventes se procedió a medir el

halo de inhibición bacteriano y además se calculó el factor de retención (Rf) del halo de inhibición observado. Para calcular el Rf se procedió a realizar la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Donde “X” fue la distancia recorrida por el compuesto e “Y” fue la distancia recorrida por el eluyente.

7.4.5.3.2. Determinación del IC50

Para determinar la concentración del extracto crudo que inhibe a la mitad de la población bacteriana se realizó la técnica de microdilución en caldo (57, 58). Para esta técnica fue necesario cultivar la cepa patógena *S. aureus* ATCC 43300 en 7 mL de Caldo Mueller Hinton (CMH) incubándola a 37°C por 24 horas. Posteriormente se utilizó placas de 96 pozos para realizar el método de microdilución en caldo, en donde a cada pocillo se le agregó 50 µL del CMH que contiene concentraciones diferentes del extracto crudo diluido en DMSO; a su vez, se añadió 50 µL del cultivo bacteriano en CMH, teniendo como concentración final 5×10^5 ufc/mL en cada pocillo. Las concentraciones a trabajar fueron 4, 3, 2 y 1 mg/mL para el extracto crudo, mientras que la concentración utilizada para el antibiótico de referencia o control positivo fue de 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 µg/mL.

Además, se realizó un control de crecimiento de la cepa ATCC en los porcentajes de DMSO utilizados para cada concentración del extracto crudo, un control de crecimiento de la cepa ATCC en CMH y un control negativo el

cual probó la esterilidad de los medios de cultivos. La placa fue incubada a 37°C por 24 horas y posteriormente se realizó la determinación del crecimiento bacteriano por medio de la lectura de la densidad óptica (OD) a 650 nm utilizando un iMark™ Microplate Absorbance Reader de BIO-RAD.

Con los resultados obtenidos se realizó una curva cuyo eje “x” estuvo representado por las diferentes concentraciones testeadas, mientras que el eje “y” estuvo representado por el porcentaje de inhibición obtenido a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Ac - Am}{Ac} \right) \times 100\%$$

Donde Ac es la absorbancia del control de crecimiento de la bacteria patógena en MH y Am es la absorbancia leída del pocillo con la bacteria patógena expuesta al extracto crudo.

Por último, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se determinó utilizando la plantilla PROBIT.

7.4.5.3.3. Determinación del MIC (57)

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) con la metodología descrita en el punto anterior; sin embargo, en este caso no se realizó la lectura de la densidad óptica de los pocillos sino se determinó de manera visual la mínima concentración del compuesto aislado que inhibe el crecimiento bacteriano en su totalidad. En este caso se reportó dicha concentración como el MIC del compuesto.

7.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el enfrentamiento de hongos contra bacterias patógenas fueron expresados como el promedio \pm error estándar de la medición del diámetro del halo de inhibición obtenido en tres repeticiones.

El análisis de los datos del potencial antimicrobiano obtenido en el enfrentamiento de cada cepa fúngica contra los patógenos bacterianos ATCC fue realizado en base a la media y desviación estándar cuando los datos seguían una distribución normal, en caso contrario el reporte se realizó en base a la mediana y rango intercuartil (RI).

Para el análisis estadístico de dichos datos se utilizó la prueba de Rango-suma de Wilcoxon o U-Mann Whitney para datos no pareados, donde se comparó los potenciales antimicrobianos de hongos aislados a partir de larvas con diferentes dietas enfrentados hacia el mismo patógeno. A su vez también se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, para comparar el potencial antimicrobiano de más de 2 poblaciones de hongos contra *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311.

Por otro lado, se calculó la concentración que inhibe a la mitad de la población (IC_{50}) utilizando la plantilla PROBIT a partir de las 3 repeticiones experimentales las mismas que fueron expresadas como el promedio \pm error estándar de la concentración mínima inhibitoria.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento de hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de *H. illucens*

Los aislamientos de cepas fúngicas obtenidas a partir del tracto digestivo de *H. illucens*, fueron realizadas en diluciones que permitían la correcta separación entre ellas (Figura 11).

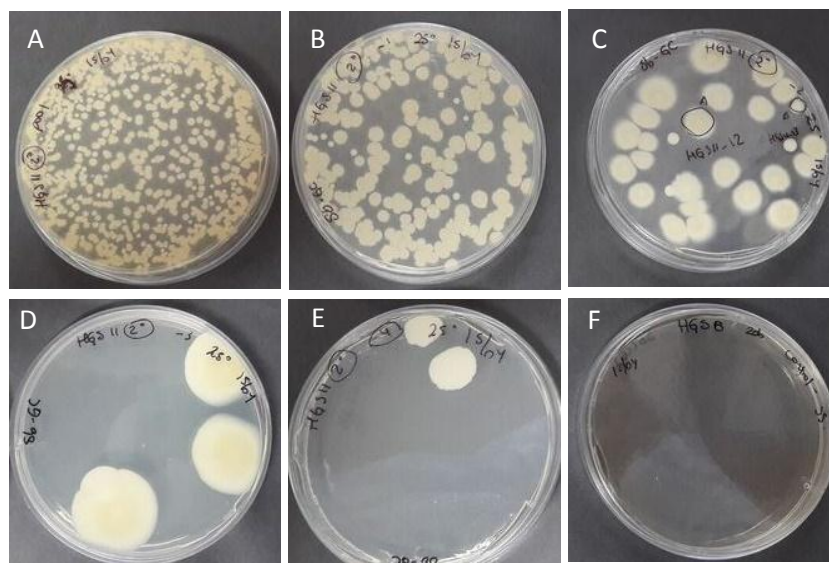


Figura 11: Cepas fúngicas obtenidas en diferentes diluciones.

A: Crecimiento de hongos a partir del pool de intestinos de larvas alimentadas con GS. B: Dilución 10^{-1} . C: Dilución 10^{-2} . D: Dilución 10^{-3} . E: Dilución 10^{-4} . F: Control de diluyente.

Se logró aislar 14 cepas fúngicas con morfotipos diferentes a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con la dieta GS. Por otro lado, se obtuvo 25 cepas fúngicas obtenidas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con la dieta GU. La descripción macro y microscópica de cada cepa fúngica aislada se detallará más adelante.

Cada cepa se encuentra preservada a tres temperaturas diferentes (4°C, -20°C y -70°C), en el laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTA vH).

8.2. Caracterización e identificación molecular de las cepas fúngicas obtenidas.

8.2.1. Caracterización macroscópica y microscópica.

Se caracterizó de manera macroscópica todas las cepas fúngicas aisladas a partir de las dos poblaciones de larvas, obteniendo una descripción detallada en la Tabla N° 1 (GS) y Tabla N° 3 (GU).

Al realizar las caracterizaciones microscópicas de cada cepa fúngica, se pudo determinar que, todas las cepas provenientes del tracto digestivo de larvas alimentadas con GS eran colonias levaduriformes (Ver tabla N°2, Anexo 1), mientras que las cepas provenientes del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU mostraron dos poblaciones fúngicas diferentes, 15 de ellas pertenecían al grupo de levaduras, mientras que las 10 restantes fueron hongos filamentosos (Ver Tabla N°4, Anexo 2 y 3).

Los géneros del grupo de cepas levaduriformes no pudieron ser identificados de manera microscópica por lo que se realizó una identificación molecular que brindaría una mayor confiabilidad en el resultado. Por otro lado, los géneros del grupo de cepas filamentosas fueron descritas de manera microscópica en la Tabla

Nº4, dichas estructuras sirvieron para la identificación presuntiva de cada cepa utilizando claves taxonómicas (49-51).

Tres cepas filamentosas (HGU11_2, 4 y 11) mostraron estructuras de reproducción asexual que inician en un conidióforo y terminan en una vesícula de las que parten fialides y conidias en forma de cadena alrededor de ella, dichas estructuras son características del género *Aspergillus* (anamorfo)(51). Las cepas HGU11_2 y 11 presentaron además estructuras de reproducción sexual llamadas cleistotecios y en cuyo interior presentan ascosporas dentro de unas bolsas llamadas ascas (49).

Cuatro cepas filamentosas (HGU11_4, 5, 6 y 7) presentaron conidióforos pequeños ramificados de donde parten conidios de base trunca en cadena, que pueden o no estar ornamentados. Este tipo de estructuras reproductivas asexuales son características del género *Scopulariopsis* (Anamorfo) (49).

La cepa filamentosa HGU11_10 presentó las estructuras características del género *Penicillium* (49, 51), con conidióforos ramificados de donde parten fialides y métulas delgadas en cuyo extremo presentan conidios pequeños en cadenas y que en conjunto parecen un pincel.

La cepa filamentosa HGU11_8 presentó la forma de un dermatofito con microconidios de base trunca y sésiles, encontrados en abundancia; sin embargo, no se pudo obtener algún tipo de identificación preliminar, ya que dichas características las posee el género *Trichophyton*, *Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Monascus* y *Eremascus* (49) por lo que sólo fue clasificado en el orden Onygenales.

Por último, la cepa HGU11_9 mostró estructuras asexuales del tipo artroconidias, las cuales son hifas que se diferencian y se dividen generando conidias pequeñas que luego se engrosan y pueden formar nuevas hifas. En este caso el género de este tipo de hongo es bastante difícil diferenciar a simple vista ya que especies como *Geotrichum* y *Ascospaera* tienen este mismo tipo de estructuras. Por este motivo se identificó el género posteriormente por técnicas moleculares.

Tabla N° 1: Descripción macroscópica de las colonias fúngicas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GS.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA								
	FORMA	ELEVACIÓN	TEXTURA	ASPECTO	SUPERFICIE	COLOR	MARGEN O BORDES	PIGMENTO	TIPO DE COLONIA
HGS11_1	Irregular	Plana y extendida	Creмоса	Opaca o seca	Con surcos radiales	Crema	Ondulado	-	Levadura
HGS11_2	Irregular	Elevada y limitada	Creмоса	Opaca o seca	Con surcos radiales	Perla	Ondulado	-	Levadura
HGS11_3	Circular	Plana y extendida	Creмоса	Brillante o húmeda	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_4	Circular	Plana y extendida	Creмоса	Brillante o húmeda	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_5	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_6	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_7	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Con surcos radiales	Perla	Lobado	-	Levadura
HGS11_8	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_9	Circular	Plana y extendida	Creмоса	Brillante o húmeda	Plegada	Perla	Liso	-	Levadura
HGS11_10	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Crema	Lobado	-	Levadura
HGS11_11	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Crema	Liso	-	Levadura
HGS11_12	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Sectorizada	Crema	Desflecado	-	Levadura
HGS11_13	Circular	Plana y extendida	Creмоса	Brillante o húmeda	Plegada	Perla	Lisa	-	Levadura
HGS11_14	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Sectorizada	Perla	Ondulado	-	Levadura

Tabla N° 2: Descripción microscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GS.

CÓDIGO DE LA CEPA FÚNGICA	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
HGS11_1	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides libres.
HGS11_2	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas libres.
HGS11_3	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas globosas y libres.
HGS11_4	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas pequeñas, globosas y libres.
HGS11_5	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y libres, que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_6	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas globosas y ovoides que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_7	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_8	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_9	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas pequeña y esférica que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_10	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_11	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas esférica que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_12	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.
HGS11_13	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman un pseudomicelio. Además presenta blastosporas globosas unidas al pseudomicelio.
HGS11_14	Colonia de levaduras unicelulares del tipo esporas del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.

Tabla N° 3: Descripción macroscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GU.

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LA COLONIA								
	FORMA	ELEVACIÓN	TEXTURA	ASPECTO	SUPERFICIE	COLOR	MARGEN O BORDES	PIGMENTO	TIPO DE COLONIA
HGM11_1	Irregular	Elevada y limitada	Cremosa	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema	Desflecado	-	Levadura
HGM11_2	Irregular	Elevada y limitada	pulverulenta	Opaca o seca	Plegada	Crema	Ondulado	-	Levadura
HGM11_3	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Crema	Lisa o entero	-	Levadura
HGM11_4	Irregular	Plana y extendida	cremosa	Opaca o seca	cerebriforme	Crema	Desflecado	-	Levadura
HGM11_5	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Crema	Lisa o entero	-	Levadura
HGM11_6	Irregular	Elevada y limitada	Cremosa	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema oscuro	Lobado	-	Levadura
HGM11_7	Irregular	Elevada y limitada	Cremosa	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema oscuro	Lobado	-	Levadura
HGM11_8.1	Irregular	Plana y extendida	Cremosa	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema	Lisa o entero	-	Levadura
HGM11_8.2	Irregular	Elevada y limitada	Pulverulenta	Opaca o seca	Cerebriforme	Blanco	Ondulado	-	Levadura
HGM11_9	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema	Lisa o entero	-	Levadura
HGM11_10	Circular	Elevada y limitada	Aterciopelada	Opaca o seca	Cerebriforme	Crema	Lisa o entero	-	Levadura
HGM11_11	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Con surcos radiales	Perla	Ondulado	-	Levadura
HGM11_12	Irregular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Crema	Ondulado	-	Levadura
HGM11_13	Circular	Plana y extendida	Aterciopelada	Opaca o seca	Plegada	Perla	Lisa o entero	-	Levadura

HGU11_1	Irregular	Plana y extendida	Cremosa	Opaca o seca	Con surcos radiales	Blanco	Ondulado	-	Levadura
HGU11_2	Circular	Elevada y limitada	Granular	Opaca o seca	Sectorizada	Ocre	Desflecado	Marrón	Moho
HGU11_3	Irregular	Plana y extendida	Granular	Opaca o seca	Plegada	Amarillo	Desflecado	Amarillo	Moho
HGU11_4	Irregular	Elevada y limitada	Aterciopelada	Opaca o seca	Sectorizada y con surcos radiales	Crema	Desflecado	-	Moho
HGU11_5	Irregular	Elevada y limitada	Aterciopelada	Opaca o seca	Sectorizada y con surcos radiales	Crema	Desflecado	-	Moho
HGU11_6	Irregular	Elevada y limitada	Aterciopelada	Opaca o seca	Sectorizada y con surcos radiales	Marron claro	Desflecado	-	Moho
HGU11_7	Irregular	Elevada y limitada	Aterciopelada	Opaca o seca	Con surcos radiales	Marron oscuro	Desflecado	-	Moho
HGU11_8	Irregular	Plana y extendida	Pulverulenta	Opaca o seca	Plegada	Blanca	Desflecado	-	Moho
HGU11_9	Filamentosa	Convexa y umbilicada	Algodonosa	Opaca o seca	Sectorizada	Blanca	Desflecado	-	Moho
HGU11_10	Filamentosa	Plana y extendida	Pulverulenta	Opaca o seca	Con surcos radiales	Verde oscuro	Desflecado	Marrón	Moho
HGU11_11	Circular	Convexa y umbilicada	Pulverulenta	Opaca o seca	Plegada	Oro	Desflecado	Marrón	Moho

Tabla N° 4: Descripción microscópica de las colonias fúngicas aisladas de tracto digestivo de larvas alimentadas con dieta GU.

CÓDIGO DE LA CEPA FÚNGICA	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
HGM11_1	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_2	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_3	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_4	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_5	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_6	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas. También se encuentran blastosporas globosas unidas a las pseudohifas.
HGM11_7	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas. También se encuentran Blastosporas globosas unidas a las pseudohifas.
HGM11_8.1	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides que forman pseudohifas.
HGM11_8.2	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas alargadas que forman pseudohifas.
HGM11_9	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides que forman pseudohifas.
HGM11_10	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas globosas que forman pseudohifas.
HGM11_11	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides y globosas que forman pseudohifas.
HGM11_12	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas ovoides que forman pseudohifas.
HGM11_13	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastosporas globosas que forman pseudohifas.
HGU11_1	Colonia de levaduras unicelulares del tipo blastospora ovoides y alargadas que forman pequeñas agrupaciones.
HGU11_2	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas de donde parte un conidióforo recto con terminación en vesícula. Pequeñas fiálides rodean a la vesícula terminando en conidios en cadenas largas. También puede observarse cleistotecios producto de la reproducción sexual del hongo.
HGU11_3	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas de donde parte un conidióforo recto con terminación en vesícula. Pequeñas fiálides rodean a la vesícula terminando en conidios esféricos de cadenas largas.

HGU11_4	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas de donde parte un conidióforo pequeño recto ramificado con fialides pequeñas que son base de las conidias subsféricas con base trunca de paredes delgadas y verrugosas en cadenas.
HGU11_5	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas y vacuolizadas, de donde parte un conidióforo pequeño recto ramificado con fialides pequeñas que son base de las conidias subsféricas con base trunca de pared delgada y verrugosa en cadena larga.
HGU11_6	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas y vacuolizadas, de donde parte un conidióforo pequeño recto ramificado con fialides pequeñas que son base de las conidias subsféricas con base trunca de pared delgada en cadena larga.
HGU11_7	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas y vacuolizadas, de donde parte un conidióforo pequeño recto ramificado con fialides pequeñas que son base de las conidias subsféricas con base trunca de pared delgada y verrugosa en cadena larga.
HGU11_8	Hongo pluricelular, hifas delgadas septadas y hialinas. Abundantes microconidias piriformes, que se encuentran sésiles al lado de las hifas en formas alternas.
HGU11_9	Hongo pluricelular, hifas delgadas hialinas. Presentan artroconidias que aparecen por la segmentación de hifas.
HGU11_10	Hongo pluricelular, hifas delgadas septadas y hialinas. Cuentan con conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas. Conidias producidas en cadenas con forma esféricas con base trunca y hialinas
HGU11_11	Hongo pluricelular filamentoso, Hifas hialinas tabicadas de donde parte un conidióforo recto con terminación en vesícula. Pequeñas fialides rodean a la vesícula terminando en conidios esféricos de cadenas largas. También puede observarse cleistotecios producto de la reproducción sexual del hongo.

8.2.2. Identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas

El método de fenol:cloroformo para la extracción de ADN de cepas levaduriformes logró obtener ADN sin ningún inconveniente. Sin embargo, dicho método no permitió la extracción de ADN en cepas filamentosas; por lo que se realizaron cambios en el protocolo que incluía el uso de mercaptoetanol con el fin de lograr romper la pared celular fúngica.

La amplificación del ADN fúngico utilizando PCR convencional con los cebadores NS5-F e ITS4-R lograron obtener productos de aproximadamente 1330 pb en la mayoría de casos (Figura 12).

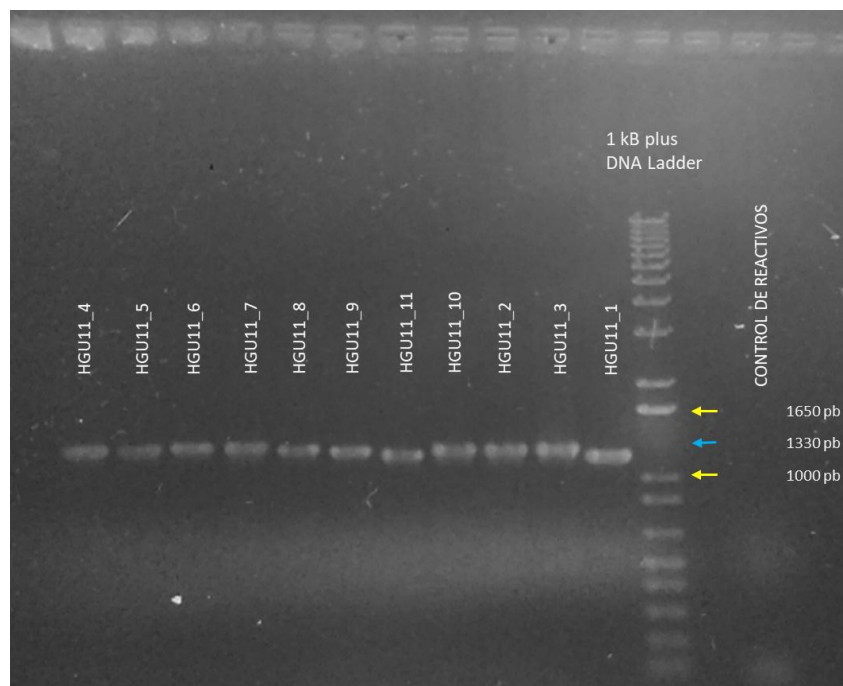


Figura 12: Productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de ADN de hongos provenientes del tracto digestivo de larvas de *H. illucens*.

Se muestra que la mayoría de ellos posee un tamaño de 1330 pb.

Posteriormente al secuenciamiento de los productos con los cebadores NS5-F, ITS4-R y NS7 (Interno); se analizaron las secuencias con la herramienta BLAST. Las especies sugeridas fueron aquellas con el mayor porcentaje de identidad y cobertura detalladas en la Tabla N° 5 y 6.

La microbiota intestinal perteneciente a la población de larvas alimentadas con dieta GS, mostró ser poco diversa, todas las cepas aisladas pertenecían al filo Ascomycota, clase Saccharomycetes y al orden Saccharomycetales con tan sólo 2 géneros diferentes: *Candida* y *Pichia* en porcentajes de 36 y 64% respectivamente siendo el género *Pichia* el más prevalente (Figura 13). Se identificó 3 especies diferentes, 9 cepas obtuvieron un 99-100% de identidad y una cobertura de 99-100% con la especie *Pichia kudriavzevii*, otras 4 cepas obtuvieron un 99% de identidad con una cobertura de 99-100% con la especie *Candida glabrata*, y sólo una cepa fue considerada como *Candida tropicalis* con un 99% de identidad y una cobertura de 100% (Tabla N°5).

La microbiota perteneciente a la población de larvas alimentadas con dieta GU, mostró tener más diversidad de géneros fúngicos teniendo un total de 4 especies de levaduras y 5 géneros de hongos filamentosos. De manera general el 56% de las cepas correspondieron al filo Ascomycota y pertenecían a 3 clases (Eurotiomycetes, Saccharomycetes y Sordariomycetes), 4 órdenes (Eurotiales, Onygenales, Saccharomycetales y Microascales) y 8 géneros diferentes (*Pichia*, *Candida*, *Stephanoascus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Arthroderma*, *Ascospaera* y *Scopulariopsis*). El 44% restante correspondieron al filo Basidiomycota, clase Tremellomycetes, orden Trichosporonales pertenecientes a los Trichosporonales

no clasificados, los mismos que resultaron ser el grupo más prevalente, seguido de *Scopulariopsis* (16%) y *Aspergillus* (12%) (Figura 13).

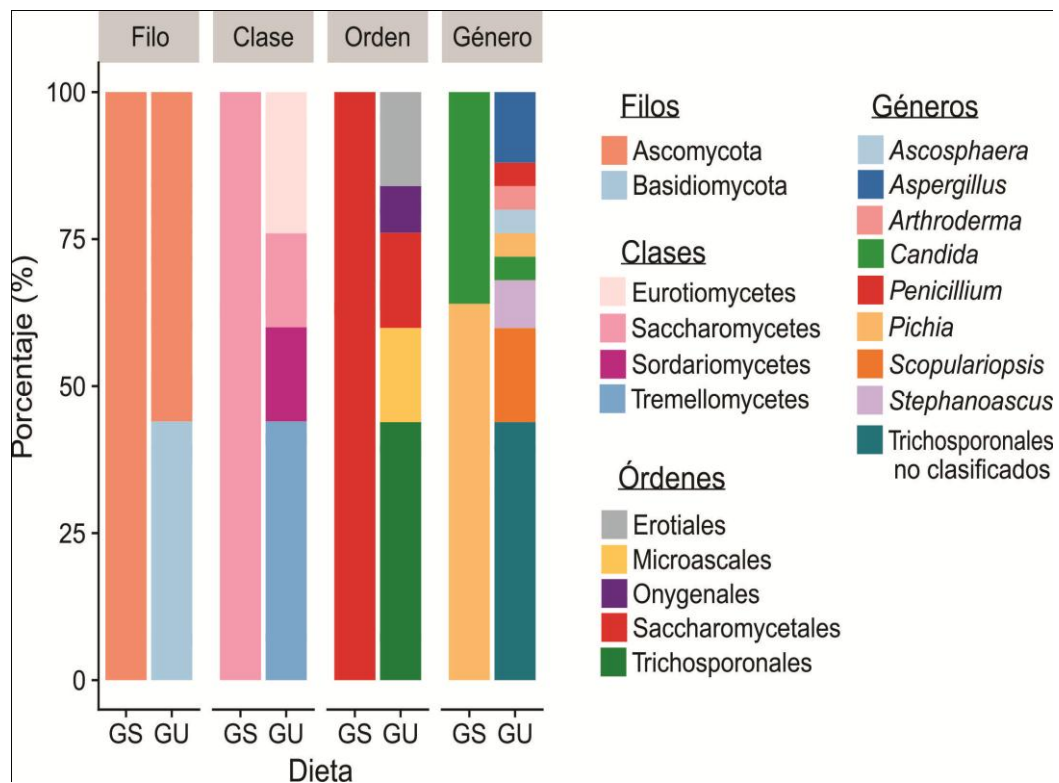


Figura 13: Composición taxonómica de la microbiota intestinal de larvas de *H. illucens*.

GS: larvas alimentadas con alimento comercial para aves, GU: larvas alimentadas con guano de gallina. Cada cepa se agrupó de acuerdo al filo, clase, orden y género al que pertenecían de acuerdo al porcentaje de su abundancia.

Las cepas levaduriformes aisladas del tracto intestinal de la población larval alimentada con GU (Tabla N° 6) mostró que, 2 cepas fueron identificadas como *Stephanoascus ciferrii* con un 100% de identidad y 53% de cobertura, y dos fueron consideradas de manera individual como *Candida pseudorugosa* (96% de identidad en un 100% de cobertura) y *Pichia kudriavzevii* (99% de identidad en un 100% de cobertura). Las 11 cepas restantes fueron consideradas como

Trichosporonales no clasificados con 99% de identidad y un 99-100% de cobertura.

Entre las cepas fúngicas filamentosas (Tabla N° 6) se obtuvo que tres de ellas pertenecían al género *Aspergillus* con una identidad de 97-98% y una cobertura de 100%. Además, 4 cepas (HGU11_4 – HGU11_7) fueron identificadas como *Scopulariosis brevicaulis* con un 99% de identidad y 82% de cobertura. La cepa HGU11_10 fue considerada como *Penicillium janthinellum* con una identidad del 98% y una cobertura de 99%; mientras que HGU11_9 fue considerada como *Ascospaera variegata* con una identidad del 89% y una cobertura de 100%.

La cepa HGU11_8 fue identificada como *Arthroderma multifidum* ya que presentó mayor identidad y cobertura (100 y 65% respectivamente); sin embargo, es necesario mencionar que dicha especie es el estadio sexual (Teleomorfo) de *Chrysosporium multifidum* (anamorfo), y que en nuestro caso, el cultivo en agar mostró estructuras reproductivas pertenecientes a este último estadio.

Tabla N° 5: Identificación molecular de cepas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con GS.

CÓDIGO	TIPO DE COLONIA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR			
		% de identidad	% de cobertura de consulta	Código de Acceso	Especie sugerida
HGS11_1	Levadura	100%	100%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_2	Levadura	100%	99%	CP021090.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_3	Levadura	99%	99%	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138
HGS11_4	Levadura	99%	99%	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138
HGS11_5	Levadura	100%	99%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_6	Levadura	99%	99%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_7	Levadura	99%	100%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_8	Levadura	99%	100%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_9	Levadura	99%	100%	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138
HGS11_10	Levadura	99%	100%	CP021092.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_11	Levadura	99%	100%	LC317532.1	<i>Candida tropicalis</i> isolate LMICRO111
HGS11_12	Levadura	99%	100%	CP028774.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP
HGS11_13	Levadura	99%	100%	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138
HGS11_14	Levadura	99%	100%	CP028774.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain SJP

Tabla N° 6: Identificación molecular de cepas aisladas a partir del tracto digestivo de larvas alimentadas con Guano de gallina.

CÓDIGO	TIPO DE COLONIA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR			
		% de identidad	% de cobertura de consulta	Código de acceso	Especie sugerida
HGM11_1	Levadura	99%	99%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_2	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_3	Levadura	99%	99%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_4	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_5	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_6	Levadura	100%	53%	AB000662.1	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
HGM11_7	Levadura	100%	53%	AB000662.1	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
HGM11_8.1	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_8.2	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_9	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_10	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_11	Levadura	99%	99%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408
HGM11_12	Levadura	99%	100%	EF060720.1	Unclassified Trichosporonales LM408

HGM11_13	Levadura	96%	100%	KT336718.1	<i>Candida pseudorugosa</i> strain CBS 10433
HGU11_1	Levadura	99%	100%	CP028774.1	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain CBS573
HGU11_2	Moho	97%	100%	AP007173.1	<i>Aspergillus</i> sp.
HGU11_3	Moho	97%	100%	AP007173.1	<i>Aspergillus</i> sp.
HGU11_4	Moho	99%	82%	AY083220.1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> strain NCPF 2177
HGU11_5	Moho	99%	82%	AY083220.1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> strain NCPF 2177
HGU11_6	Moho	99%	82%	AY083220.1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> strain NCPF 2177
HGU11_7	Moho	99%	82%	AY083220.1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> strain NCPF 2177
HGU11_8	Moho	100%	65%	AB861747.1	<i>Arthroderma multifidum</i>
HGU11_9	Moho	89%	100%	JX268538.1	<i>Ascospaera variegata</i>
HGU11_10	Moho	98%	99%	AB293968.1	<i>Penicillium janthinellum</i>
HGU11_11	Moho	98%	100%	EF614252.1	<i>Aspergillus</i> sp.

8.3. Pruebas de antagonismo frente a patógenos bacterianos ATCC

Se determinó el potencial antimicrobiano para cada una de las cepas aisladas a partir de larvas alimentadas con 2 dietas diferentes (GS y GU), y enfrentadas contra dos patógenos bacterianos (*S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311). El reporte del potencial antimicrobiano se realizó de manera independiente para los hongos levaduriformes obtenidos a partir de larvas alimentadas con la dieta GS, los hongos levaduriformes obtenidos a partir de larvas alimentadas con la dieta GU y los hongos filamentosos obtenidos a partir de larvas alimentadas con la dieta GU.

Además, para el caso de los antagonismos realizados con levaduras, se catalogó cada halo de inhibición de acuerdo a su claridad y su potencial antimicrobiano (Figura 14). La claridad fue clasificada en 3 categorías ordinales. Los halos con poca transparencia o tenues (menor efecto inhibitorio) fueron catalogados con una cruz (+), mientras que halos con transparencia media fueron catalogados con dos cruces (++) y halos con mayor transparencia fueron catalogados con tres cruces (+++).



Figura 14: Determinación de los halos de inhibición catalogados según su transparencia.

Los círculos cremas son las levaduras cultivadas en bloques de ASB; alrededor se observa los diferentes grados de inhibición de las bacterias ATCC inmersas en AN, teniendo halos catalogados con una cruz (A), dos cruces (B) y tres cruces (C).

La población de hongos levaduriformes aislados a partir de larvas alimentadas con GS constó de 14 cepas (Figura 15, Anexo 1). El enfrentamiento de dichas cepas no mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 43300. Al contrario, 13 de estas mismas cepas mostraron actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 presentando una mediana de 1.77 (RI =0.3, p25 = 1.58, p75 = 1.88). Sólo la cepa identificada como *Candida tropicalis*, no presentó actividad contra los dos patógenos probados (Valores de actividad antimicrobiana detallados en Anexo 4).

En esta población de hongos levaduriformes se observó que las cepas activas contra *S. Typhimurium* ATCC 43300 fueron identificadas como *Candida glabrata* y *Pichia kudriavzevii*. El potencial antimicrobiano de todas las cepas identificadas como *C. glabrata* (Mediana = 1.5, RI = 0.1, p25 = 1.46, p75 = 1.56) fue menor y estadísticamente significativo (P=0.0001, test de Mann-Whitney) al potencial antimicrobiano de las cepas identificadas como *P. kudriavzevii* (Mediana = 1.88, RI = 0.13, p25 = 1.75, p75 = 1.88). Por otro lado, se observó que los halos de inhibición producidos por *C. glabrata* fueron categorizados como una inhibición tenue (+), mientras que los producidos por *P. kudriavzevii* fueron categorizados como tenues a moderados (+, ++).

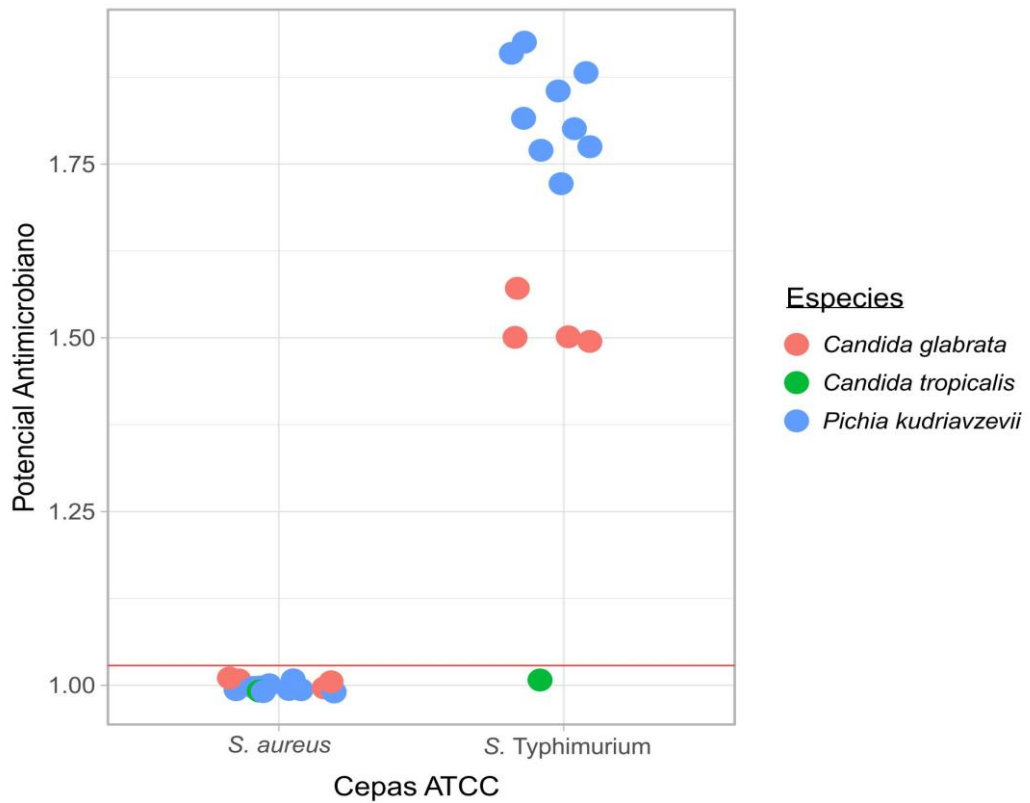


Figura 15: Potencial antimicrobiano de hongos levaduriformes aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GS.

Los puntos representan el potencial antimicrobiano de cada cepa aislada contra los patógenos bacterianos *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311. Los colores las agrupan con la especie a la cual pertenece. La línea roja es arbitraria y diferencia entre las cepas levaduriformes con actividad antimicrobiana (por encima de ella) y las que no presentan actividad (por debajo de ella).

La población de hongos levaduriformes aisladas a partir de larvas alimentadas con GU estuvo constituida por 15 cepas (Figura 16, Anexo 2). El enfrentamiento de dichas cepas mostró que 14 de ellas fueron activas contra *S. aureus* ATCC 43300 presentando una mediana de 2.71 (RI = 0.34, p25 = 2.54, p75 = 2.88).

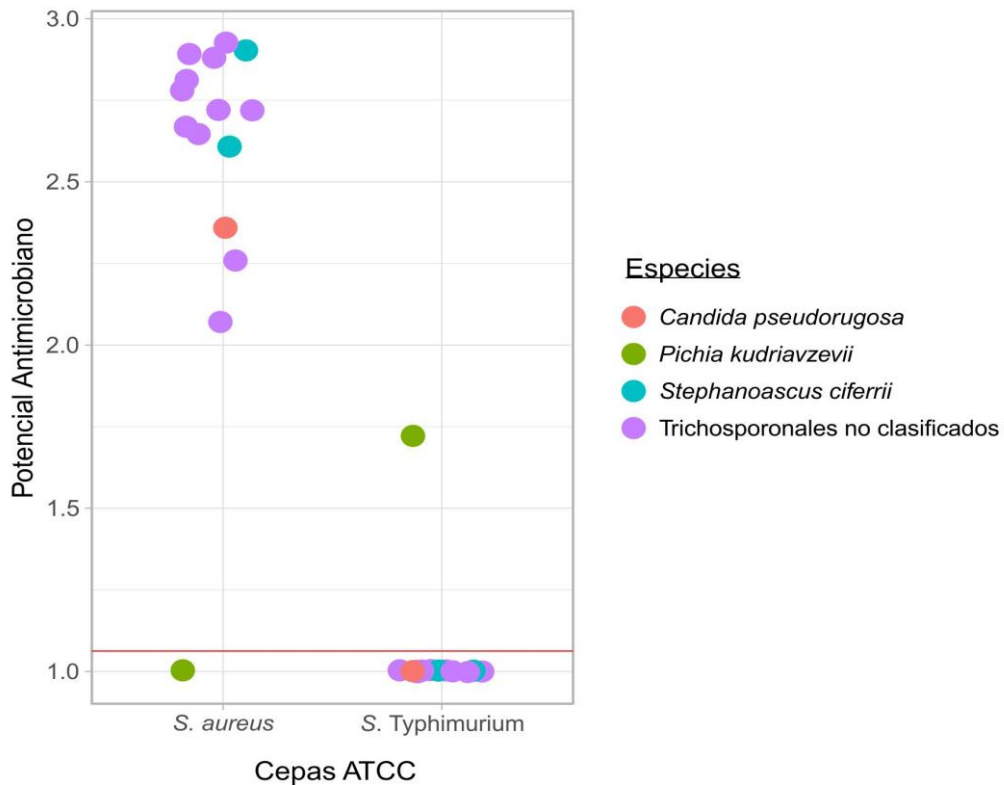


Figura 16: Potencial antimicrobiano de hongos levaduriformes aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU.

Los puntos representan el potencial antimicrobiano de cada cepa aislada contra los patógenos bacterianos *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 1331. Los colores las agrupan con la especie a la cual pertenece. La línea roja es arbitraria y diferencia entre las cepas levaduriformes con actividad antimicrobiana (por encima de ella) y las que no presentan actividad (por debajo de ella).

En esta población de hongos levaduriformes se observó que las cepas activas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 fueron identificadas como *Candida pseudorugosa* (Mediana = 2.54, RI = 1.04, p25 = 1.75, p75 = 2.79), *Stephanoascus ciferrii* (Mediana = 2.63, RI = 0.33, p25 = 2.63, p75 = 2.96), y cepas de Trichosporonales no clasificados (Mediana = 2.75, RI = 0.38, p25 = 2.5, p75 = 2.88). No se observó diferencias significativas en el potencial antimicrobiano entre las cepas activas contra *S. aureus* ATCC 43300 (P= 0.5031, test de Kruskal Wallis). Además, se observó que los halos de inhibición producidos por las cepas

activas fueron categorizados como una inhibición tenue (+). Por otro lado, sólo 1 cepa mostró actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 y fue identificada como *P. kudriavzevii* (Valores de actividad antimicrobiana detallados en Anexo 5).

Finalmente, la población de hongos filamentosos aislados a partir de larvas alimentadas con GU constó de 10 cepas (Figura 17, Anexo 3). El enfrentamiento de dichas cepas mostró que 4 de ellas presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 43300 presentando una mediana de 1.3 (RI= 0.37, p25=1.1, p75=1.47). Mientras que 5 cepas mostraron actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 presentando una mediana de 1.17 (RI= 0.04, p25=1.16, p75=1.2). Sólo la cepa identificada como *Ascospaera variegata*, no presentó actividad contra los dos patógenos probados (Valores de actividad antimicrobiana detallados en Anexo 6).

En esta población de hongos filamentosos se observó que las cepas activas contra *S. aureus* ATCC 43300 fueron identificadas como *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus* sp. y *Arthroderma multifidum*, observándose diferencias significativas entre sus potenciales antimicrobianos (P=0.01, test de Kruskal wallis). El potencial antimicrobiano contra *S. aureus* ATCC 43300 de *A. multifidum* y *P. janthinellum* fue mayor y estadísticamente significativo respecto a la cepa de *Aspergillus* sp. (P= 0.0176 para ambas especies, test de Mann-Whitney). *P. janthinellum* y *A.*

multifidum presentaron los potenciales antimicrobianos más altos, dicho potencial fue similar en ambas especies (P=0.0765, test de Mann-Whitney).

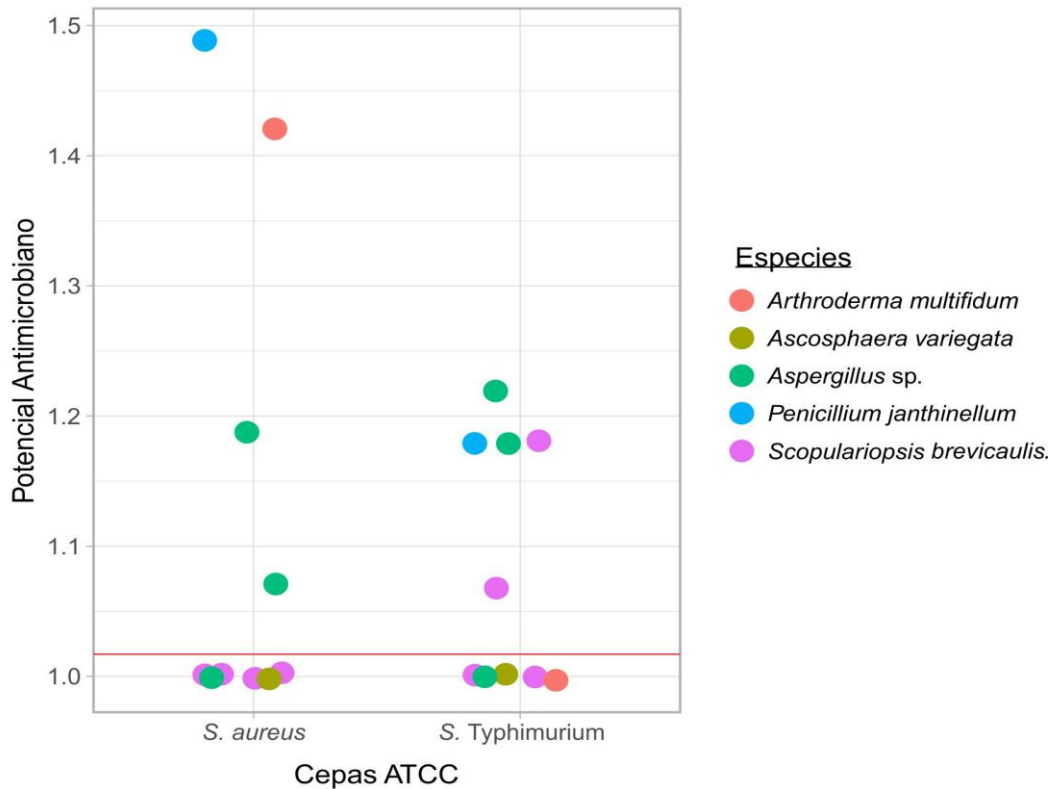


Figura 17: Potencial antimicrobiano de hongos filamentosos aislados del tracto digestivo de larvas alimentadas con GU.

Los puntos representan el potencial antimicrobiano de cada cepa aislada contra los patógenos bacterianos *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311. Los colores las agrupan con la especie a la cual pertenece. La línea roja es arbitraria y diferencia entre las cepas filamentosas con actividad antimicrobiana (por encima de ella) y las que no presentan actividad (por debajo de ella).

Por otro lado, las cepas activas contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 fueron identificadas como *Aspergillus* sp., *P. janthinellum* y *Scopulariopsis brevicaulis*. El potencial antimicrobiano de estas cepas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ellas (P= 0.1, test de Kruskal wallis).

Los resultados de los controles positivos de inhibición bacteriana con tetraciclina presentaron repetitividad, obteniendo potenciales antimicrobianos de 3.17 ± 0.18 contra *S. aureus* ATCC 43300 y 2.63 ± 0.15 contra *S. Typhimurium* ATCC 13311.

Con estos resultados se determinó que a pesar que las cepas levaduriformes mostraron un alto potencial antimicrobiano, no fueron capaces de mostrar una inhibición completa contra alguna de las cepas bacterianas patógenas ATCC y no fueron consideradas como cepas productoras de antimicrobianos prometedores. Por este motivo, se decidió seleccionar a las cepas filamentosas con alto potencial antimicrobiano como candidatas a nuestro estudio.

Como se puede observar en la Figura 17 las cepas filamentosas más prometedoras fueron HGU11_10 (*P. janthinellum*) y HGU11_8 (*A. multifidum*), con un potencial antimicrobiano para *S. aureus* ATCC 43300 de 1.49 ± 0.01 y 1.42 ± 0.03 respectivamente. Al tomar en cuenta las dos condiciones para la elección de la cepa a trabajar, se optó por la cepa HGU11_8 identificada como *A. multifidum* que mostraba menos reportes de estudios de producción de compuestos antimicrobianos, en comparación con el género *Penicillium*.

8.4. Evaluación antibacteriana del hongo promisorio

El rendimiento de extracto crudo obtenido a partir del cultivo en medio líquido de la cepa HGU11_8 (*A. multifidum*) fue de 142 mg/L y tenía como característica resaltante su alta viscosidad, además de poseer una coloración amarillenta. El extracto se diluía de manera completa en Acetato de etilo y en DMSO; y si se diluía en compuestos acuosos como caldos de cultivo, tenía la tendencia a emulsionar.

La cepa HGU11_8 fue evaluada de manera preliminar a partir de dicho extracto crudo por medio de la técnica de bioautografía para detectar si el hongo era efectivamente productor natural de algún compuesto antimicrobiano. Al realizar la bioautografía por punto en 3 concentraciones diferentes del extracto crudo (100, 200 y 300 μg) contra los dos patógenos ATCC, observamos que era inefectivo para inhibir a *S. Typhimurium* ATCC 13311 en todas las concentraciones estudiadas (Figura 18A). Sin embargo, al ser enfrentado contra *S. aureus* ATCC 43300, se observó que aún la concentración más baja estudiada (100 μg) del extracto crudo podía inhibir de manera tenue al patógeno bacteriano antes mencionado (Figura 18B) con un halo de inhibición de 6 mm.

Éste perfil fue mejorando conforme se aumentaba la concentración del extracto (8 mm de halo de inhibición bacteriano para 200 y 300 μg del extracto crudo). Por último, el control positivo fue exitoso y reproducible en ambos experimentos obteniendo halos de inhibición de 14 mm para *S. Typhimurium* ATCC 13311 y 18 mm para *S. aureus* ATCC 43300 cuando se utilizaba 0.25 μg de tetraciclina; mientras que los controles negativos y positivos de crecimiento mostraron resultados de acuerdo a lo esperado.

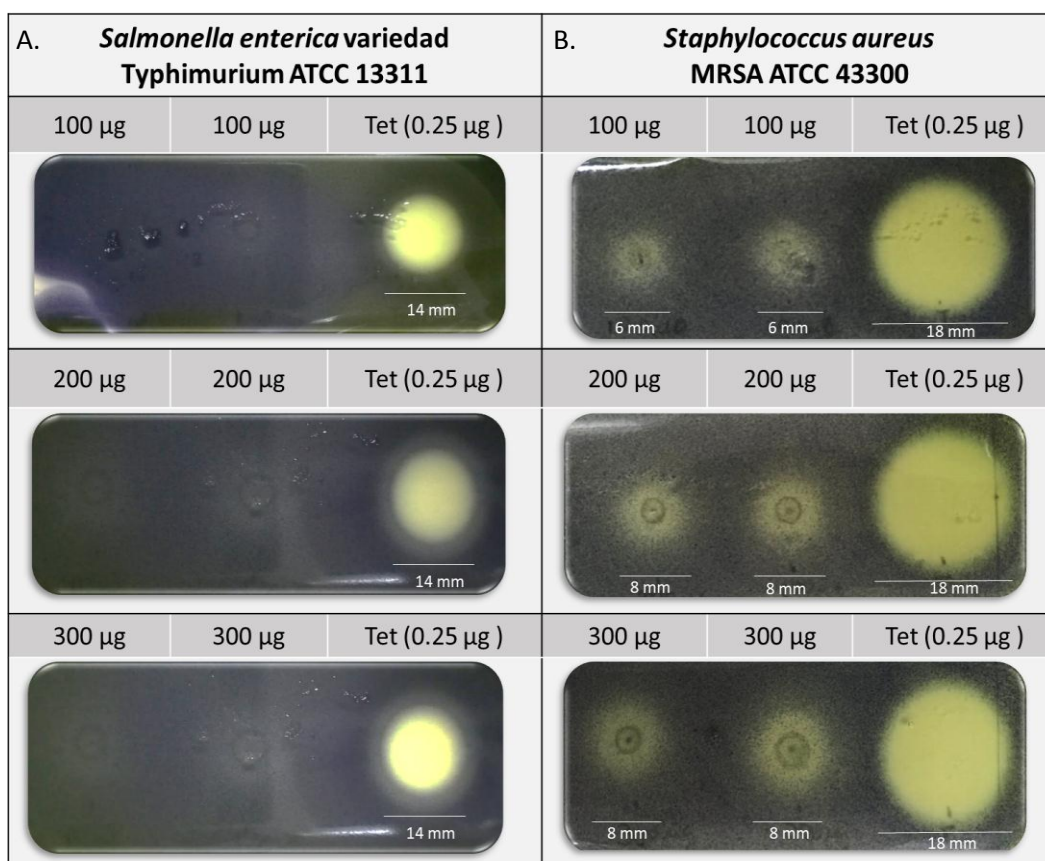


Figura 18: Bioautografía por punto del extracto crudo del hongo.

El enfrentamiento se realizó en concentraciones de 100, 200 y 300 µg contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 (A) y *S. aureus* ATCC 43300 (B). Se visualiza de color amarillo los halos de inhibición producidos por el extracto, mientras que el color azul oscuro es la prueba del crecimiento óptimo de cada bacteria.

Al realizar la bioautografía en TLC con corrida en sistema de solventes, se pudo visualizar también el perfil del extracto crudo a 254 y 366 nm (Figura 19). La visualización a 254 nm mostró una buena separación de bandas, de manera visual las bandas mayoritarias tenían un Rf de 0.84, 0.51 y 0.18; mientras que las bandas minoritarias fueron observadas mejor a una longitud de onda de 366 nm con Rf menor a 0.38; en esta longitud de onda de pudo observar que existía una banda con un Rf de 0.88 bastante cercana a una de las bandas mayoritarias observadas a una longitud de onda de 254 nm con Rf de 0.84 (Figura 19).

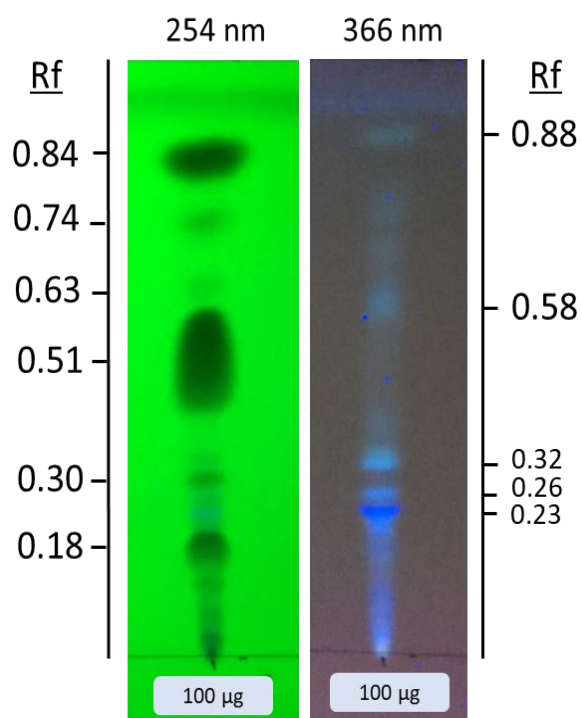


Figura 19: Perfil del extracto crudo del hongo HGU11_8 en TLC.
 Se observa el perfil de compuestos en dos longitudes de onda (254 nm y 366 nm) presentes en el extracto luego de utilizar la fase móvil Diclorometano:Metanol (9.5:0.5).

Los resultados de la bioautografía mostraron actividad antimicrobiana con un halo de inhibición de 6 mm de diámetro y con un Rf de 0.87, el responsable de dicha inhibición sería entonces la banda visualizada a 254 nm con un Rf de 0.84 (Figura 20).

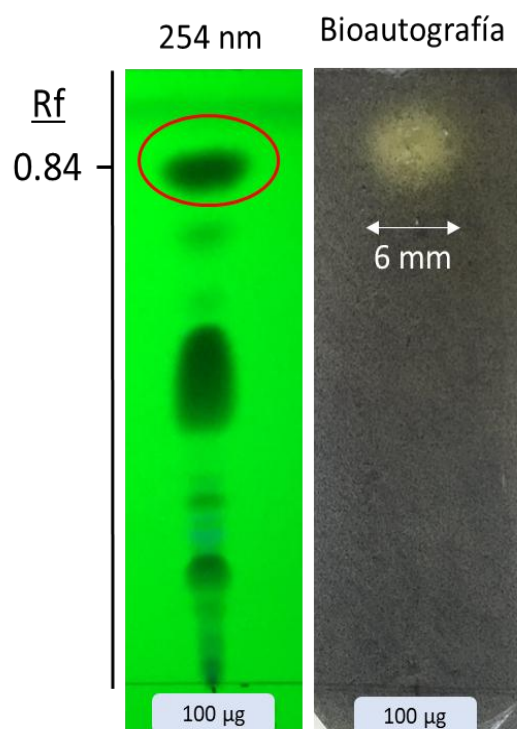


Figura 20: Comparación del perfil del TLC con la bioautografía por corrida de solventes del extracto crudo.

Bioautografía del extracto crudo del hongo (derecha) contra *S. aureus* ATCC 43300, comparado con el perfil del extracto en TLC visualizado a 254 nm (izquierda). El compuesto marcado de rojo (RF=0.84) es el posible causante del halo de inhibición bacteriano.

Por otro lado, se determinó IC₅₀ y MIC del extracto crudo del hongo activo por medio de la metodología de microdilución en caldo. Obteniendo que el valor de IC₅₀ del extracto crudo frente a la cepa patógena *S. aureus* ATCC 43300 fue de 1.6 ± 0.16 mg/mL con un MIC de 4 mg/mL. Mientras que el control positivo (tetraciclina) mostró un IC₅₀ de 0.056 ± 0.002 µg/mL con un MIC de 0.3 µg/mL para la misma cepa patógena.

9. DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes biológicas de compuestos antibióticos ha sido propiciada por la envergadura de la resistencia antimicrobiana que se observa día a día. Actualmente se sabe que la microbiota intestinal de diversos organismos es responsable de protegerlos contra bacterias patógenas, incluso en sistemas tan pequeños como lo es el intestino de diversos insectos. Las larvas de *H. illucens* son un ejemplo bastante claro de este hecho, ya que gracias a su microbiota intestinal son capaces de sobrevivir a las condiciones agrestes de su alimento reduciendo a la población de bacterias patógenas que puede encontrarse habitándolo (3, 4, 19). Diversos autores reportan a bacterias y hongos benéficos productores de moléculas antimicrobianas que ayudarían en la protección contra poblaciones microbianas dañinas impidiendo su colonización en el tracto digestivo de insectos (25, 32).

Este trabajo de investigación se centra en la exploración de la micobiota de las larvas de *H. illucens*, que ha demostrado ser uno de los campos menos estudiados de esta especie y por tanto con un potencial antimicrobiano poco conocido con muchas posibilidades de obtener un recurso interesante. Por este motivo se aisló, identificó y evaluó a los microorganismos fúngicos del tracto digestivo de dos poblaciones de larvas alimentadas con diferentes dietas: larvas alimentadas con alimento comercial para aves (GS) y larvas alimentadas con guano de gallina (GU) con la finalidad de determinar la existencia de hongos intestinales que produjeran sustancias antimicrobianas capaces de hacer frente a patógenos bacterianos.

Los primeros objetivos de esta tesis fueron secuenciales, iniciando en el aislamiento y posterior identificación de la micobiota que habita el tracto digestivo de larvas de

H. illucens. El estudio de hongos dentro de este hábitat no ha sido muy profundizado en comparación a los grupos bacterianos, es más, éste estudio es uno de los primeros en reportar las especies de cepas fúngicas cultivables aisladas del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* con las dietas GS y GU bajo condiciones de laboratorio.

La alimentación control (GS) utilizada en la crianza de una de las poblaciones larvales, fue un alimento enriquecido con las cantidades ideales de nutrientes para el desarrollo correcto de un organismo, además dicho alimento no se encontró en contacto con patógenos microbianos y por tanto no es un medio hostil para ellas. Los tractos intestinales de estas larvas mostraron únicamente la presencia de hongos levaduriformes lo cual concuerda con los reportes de Varotto et al. en donde la mayoría de las cepas aisladas fueron del tipo levaduras y el único hongo filamentoso aislado fue *Geotrichum candidum* (59). En nuestro caso se observó una alta cantidad de levaduras del filo Ascomycota, todas ellas pertenecientes a la clase Saccharomycetes con poca diversidad de géneros (*Pichia* y *Candida*) y con mayor predominancia (64%) de la especie *Pichia kudriavzevii*. La presencia de ambos géneros en el tracto intestinal de larvas alimentadas con GS no ha sido reportada y son contrastantes a los hallazgos de Varotto et al. (59) quienes a partir de un alimento similar pudieron aislar mayor diversidad de cepas pertenecientes a los géneros *Trichosporon* y *Geotrichum* provenientes de larvas criadas por 14 días con alimento para pollo; mientras que a los 17 días de vida, las larvas presentaron una microbiota diferente, mostrando predominantemente las especies *Debaryomyces* y *Rhodotorula*. Cabe resaltar que ambos experimentos estuvieron provistos de un tratamiento inicial con antibióticos; es decir, se suministraba alimento para pollo con agentes antimicrobianos por los primeros 7 días de vida.

Los hechos presentados por Varotto et al. (59) nos lleva a suponer que la edad o estadio larval influye mucho en la diversidad de cepas fúngicas dentro del tracto digestivo por lo cual, la colecta de larvas en diferentes estadios debería ser un estudio próximo para diferenciar la fluctuante microbiota a través del tiempo. En nuestro caso, las larvas colectadas tienen 11 días de vida y con alimento GS constante desde su eclosión sin ningún tipo de antibiótico; por lo que sería muy difícil realizar una comparación certera con los muestreos de Varotto et al.(59), no obstante nos sirve como una primera referencia.

La microbiota que reportamos para esta población larval alimentada con GS, está emparentada con la microbiota de insectos del orden Diptera e Hymenoptera. La levadura *Pichia kudriavzevii* (Teleomorfo de *Candida krusei*) también conocida como *Issatchenkia orientalis* (sinonimia) (60, 61) ha sido aislada de manera frecuente del tracto digestivo de larvas de *Bactrocera tryoni* (62) y dentro del intestino de *Drosophila* (63), a su vez *P. kudriavzevii* y *C. glabrata* (sinonimia: *Torulopsis glabrata*) han sido reportados en el tracto intestinal de abejas (63). Mientras que *Candida tropicalis* (sinonimia: *Monilia tropicalis*) ha sido aislada a partir de insectos de la familia Vespidae (64).

Por otro lado, la alimentación con GU utilizada en la crianza de la segunda población de larvas de *H. illucens* puede presentar diversos patógenos bacterianos además de coexistir con la microbiota propia del sustrato (65). Aún no hay referencias previas sobre la microbiota intestinal de larvas de *H. illucens* alimentadas con GU; sin embargo, comparándose con la microbiota encontrada en la dieta GS observamos una mayor diversidad de géneros que no sólo pertenecen al filo Ascomycota sino también al filo Basidiomycota. En este caso los hongos de mayor

predominancia pertenecen a la clase Tremellomycetes destacando los hongos no clasificados del orden Trichosporonales (Ver Figura 13).

Los hongos levaduriformes menos abundantes fueron identificados como *Stephanoascus ciferrii* (sinonimia: *Trichomonascus ciferrii*, anamorfo: *Candida ciferrii*), *Candida pseudorugosa* (anamorfo, sinonimia: *Diutina pseudorugosa* (66)) y *Pichia kudriavzevii* (Sinonimia: *Issatchenkia orientalis*, Anamorfo: *Candida krusei*); de hecho, se aisló también hongos filamentosos identificados como *Arthroderma multifidum* (anamorfo: *Chrysosporium multifidum*) (67, 68), *Ascosphaera variegata*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium janthinellum*, y *Scopulariopsis brevicaulis* (Sinonimia: *Penicillium brevicaule*, Teleomorfo: *Microascus brevicaulis*). Por último, la única especie ubicua aislada a partir de ambas dietas fue *Pichia kudriavzevii*; sin embargo, se encontraba en mucho menor proporción en larvas alimentadas con la dieta GU (9%) que con la GS (64%). Los géneros como *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium* y *Penicillium* han sido reportados anteriormente en guano de pollo (65) lo que nos lleva a respaldar la sugerencia de Varotto et al. (2017) que indican la selectividad de diferentes comunidades fúngicas a partir del tipo de sustrato en el que se alimentan (59).

Una de las limitantes de este estudio fue no tener los datos certeros de la composición fúngica dentro de cada dieta (GU y GS) que podría respaldar el anterior enunciado. Esta información podría servir para comparar a las especies de hongos ubicuas del sustrato (GU) y del tracto digestivo de la mosca, con el fin de inferir a las especies de hongos que transitan en el proceso de alimentación de *H. illucens*; así como también sugerir a las especies fúngicas que se encuentren siendo

seleccionadas naturalmente dentro de su tracto digestivo por las mismas condiciones ambientales que éste posee.

La importancia del descubrimiento de este tipo de microorganismos fúngicos dentro del tracto digestivo de las larvas de *H. illucens* se basa en el propósito que estarían desempeñando como endosimbiontes. Desde hace mucho tiempo se sabe que las levaduras son microorganismos benéficos dentro del tracto digestivo de cualquier individuo bajo los parámetros adecuados. Pese a ello no se tiene conocimiento certero del beneficio que estaría obteniendo las levaduras a partir de esta simbiosis; sin embargo, sí se sabe de los beneficios que obtienen los insectos al tenerlas como endosimbiontes, tanto es así que muchas veces es difícil discernir si existe realmente un mutualismo (69).

Por un lado las levaduras proveen a los insectos de enzimas importantes que mejoran la digestión de sus alimentos; como es el caso de las exo y endoinulinasas que pueden degradar la inulina a monómeros de fructosa (70) y que pueden ser asimiladas por los insectos (71). Además, producen aminoácidos esenciales, vitaminas y esteroides que son aprovechados directamente por los insectos (27, 72, 73). Adicionalmente están muy relacionadas a la detoxificación dentro del tracto digestivo de diversos insectos neutralizando toxinas y permitiendo que éstas sean excretadas sin generar daño (72, 74). Del mismo modo, son conocidas por participar en la comunicación química de los insectos ya que se sugiere que los compuestos volátiles emitidos por las levaduras pueden ser atractantes para su reproducción o generadores de señales que permiten conocer el lugar idóneo para su oviposición. Por último y lo más importante es que pueden brindar protección frente a las invasiones microbianas deteniendo la colonización de patógenos microbianos (75).

Los insectos, por otro lado, le brindan a las levaduras de un ambiente protegido y favorable para su crecimiento, así como también cumplen la función de dispersión hacia diferentes hábitats (73, 76-78)

En contraste con las levaduras, los hongos filamentosos no han sido estudiados directamente como endosimbiontes, más bien son vistos como oportunistas y en otros casos como patógenos, por lo que no se tiene mucha información sobre el beneficio que aportan dentro del tracto digestivo de los insectos. Lo que se ha hallado es la relación directa de su aislamiento dentro del insecto, con su presencia en el sustrato en el que habitan los huéspedes, esto incrementa la probabilidad de que sean organismos asimilados junto con el alimento y que estarían siendo seleccionados dentro del sistema biológico de la mosca para su conveniencia (por contar con enzimas o hasta incluso sustancias antimicrobianas benéficas) a cambio de brindarles un ambiente con la suficiente cantidad de nutrientes para su desarrollo (79). Se sabe que incluso algunos de estos hongos seleccionados son capaces de sobrevivir en unas cavidades glandulares o invaginaciones cuticulares llamadas micangias donde pueden desarrollarse y reproducirse siendo favorablemente transportadas a nuevos hospederos gracias a los insectos (80, 81)

El siguiente objetivo de esta tesis se centró en determinar si las cepas fúngicas aisladas anteriormente, mostraban actividad antimicrobiana contra dos cepas bacterianas ATCC. Existe evidencia de la presencia de microorganismos dentro del intestino de cualquier ser vivo con la capacidad de producir o secretar ciertos metabolitos secundarios cuyo propósito es inhibir el crecimiento de otros microorganismos dañinos (74, 82, 83). La microbiota hallada en las larvas alimentadas con la dieta GS detalla a 3 especies de levaduras (*Pichia kudriavzevii*,

Candida glabrata y *Candida tropicalis*) y 2 de ellas mostraron actividad antimicrobiana (*P. kudriavzevii* y *C. glabrata*) contra el patógeno *S. Typhimurium* ATCC 13111.

Estudios previos demuestran que muchas levaduras del género *Candida* y *Pichia* tienen este tipo de perfil antimicrobiano (84). Lo más reportado de estos géneros es su actividad antagonista gracias a las toxinas que producen denominadas “Toxinas asesinas” (killer toxins) o “Miocinas” que pueden inhibir el crecimiento de levaduras de perfil sensible o susceptible. No obstante, la actividad antagonista contra bacterias no parece ser tan documentada. El primer hallazgo fue en el año 1909 donde Hayduck (85) reportó una toxina termolábil muy parecida a una amina producida por levaduras, que inhibía el crecimiento de *E. coli* y bacterias *Staphylococci*. Los estudios recientes (86) reportaron a diversas especies de *Candida* entre las que se encontraba *C. tropicalis*, como una de las cepas con actividad antibacteriana moderada contra *E. coli*, y que presentó una actividad negativa contra *S. aureus*. Nuestros resultados confirman que *C. tropicalis* es inactiva contra *S. aureus* ATCC 43300; además no mostró actividad contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 pese a ser una cepa gram negativa al igual que *E. coli*. Hace algunos años se comprobó que la especie *P. kudriavzevii* puede producir una toxina asesina que tiene actividad antimicrobiana contra bacterias de diversos tipos, ya que inhibió bacterias gram positivas como *Enterococcus faecalis* y *S. aureus*; y bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* (87). También se ha comprobado la actividad antimicrobiana del sobrenadante del cultivo de una cepa perteneciente a la misma especie contra *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella flexneri*, *Pseudomonas mirabilis*, y *Salmonella paratyphi* (88). Mientras que su anamorfo, *C. krusei*, ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra *E coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *Bacillus cereus* (89). Nuestros reportes confirman efectivamente que esta especie de levadura tiene actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311; sin embargo, no presentó ningún tipo de actividad contra *S. aureus* ATCC 43300.

Por otro lado, la especie *C. glabrata* no ha sido reportada como activa contra ningún patógeno bacteriano, por lo que éste estudio mostraría una primera evidencia de su actividad antibacteriana contra *S. Typhimurium* ATCC 13311; por el contrario, se ha reportado su comportamiento contra otras levaduras mencionando que *C. glabrata* es una levadura sensible que es susceptible a ser inhibida por levaduras productoras de las “Toxinas asesinas”. En otra publicación (90) se reportó que diversas especies del género *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Metschnikowia* tienen la capacidad de inhibir al patógeno *S. Typhimurium* ATCC 14028; sin embargo dichas cepas no pertenecen a las especies que aislamos.

Cabe resaltar que en nuestros ensayos de enfrentamiento de las cepas levaduriformes contra las bacterias patógenas ATCC se evidencian halos de inhibición bacteriana con diferentes grados de opacidad, esto podría deberse a que los metabolitos excretados por la levadura poseen actividades bacteriostáticas mas no bactericidas, ya que no elimina de manera total a la bacteria patógena, en cambio la inhibe de manera parcial disminuyendo el diámetro del crecimiento de cada unidad formadora de colonia bacteriana evidenciándose un “fenómeno de arrastre” (91). Este fenómeno se ha observado en hongos enfrentados con diferentes

antifúngicos y normalmente se asocia con la capacidad que tiene el microorganismo de regular algunos genes para generar resistencia, además se ha reportado que el inóculo, la temperatura e incluso el pH puede estar interviniendo en dicho fenómeno (92). En otros casos se puede relacionar este efecto a la poca o mucha difusión que presentan los compuestos excretados por las levaduras. La difusión dentro del agar depende mucho de la naturaleza del compuesto y de la solubilidad que presente en el agar utilizado; por este motivo, es importante determinar el agar adecuado para realizar las pruebas de inhibición bacterianas. En algunos artículos se menciona que es preferible utilizar AMH cuando se realizan pruebas de inhibición microbiana con antibióticos conocidos para eliminar el efecto de arrastre (93); sin embargo, en nuestro caso es difícil discernir el agar idóneo ya que no se sabe cuál será el comportamiento químico que mostrarán los compuestos excretados por las levaduras. Por otro lado, la microbiota hallada en las larvas alimentadas con la dieta GU muestran mayor diversidad de géneros que los aislamientos con la dieta GS y por tanto tienen una actividad antimicrobiana más diversa que inhibe alguno de los dos patógenos estudiados (*S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311). Tres de las 4 especies de cepas levaduriformes aisladas (*Candida pseudorugosa*, *Stephanoascus ciferrii*, y cepas de Trichosporonales no identificadas) muestran un patrón similar de actividad positiva contra *S. aureus* ATCC 43300, mientras que no presentaron actividad contra *S. Typhimurium* ATCC 13311. Estas especies son conocidas por ser productoras de “toxinas asesinas” por lo que sus estudios se centran básicamente en conocer su antagonismo contra otras levaduras (94), no obstante aún no se reporta su actividad antibacteriana.

Proponemos que la razón por la cual las cepas fúngicas aisladas a partir de este grupo poblacional de larvas muestran actividad contra *S. Typhimurium* ATCC 13311 y *S. aureus* ATCC 43300 es la gran cantidad de patógenos microbianos que habitan la dieta GU tales como *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei* y *Klebsiella pneumoniae*, así como también *E. coli* y *Staphylococcus* sp. (95), además de *Enterococcus faecalis*, *Bordetella* sp, *Brevibacterium avium* y *Clostridium* sp. (96). Este hecho sugiere que probablemente la población larval ha adquirido ciertos hongos externos que han estado expuestos a la presión de habitar junto a estos patógenos bacterianos y por ello han podido desarrollar mecanismos para combatirlos.

Cabe mencionar que la valorización de las cepas fúngicas aisladas va más allá de su poder antibacteriano, ya que también pueden ser consideradas más adelante como posibles candidatas a probióticos debido a que pueden hacer frente a bacterias intestinales (97) como *S. Typhimurium* ATCC 13311. Y sabiendo que su origen es el tracto digestivo, pueden tener tolerancia a ambientes con cierto grado de acidez con el fin de habitar lugares parecidos y realizar la función probiótica (98).

En este contexto, las levaduras podrían actuar contra los patógenos entéricos por diferentes mecanismos, uno de ellos es la prevención de la adherencia bacteriana y la translocación en las células epiteliales intestinales, además pueden producir factores que neutralizan toxinas bacterianas y modulan las vías de señalización del hospedero con respuestas inflamatorias durante la infección bacteriana (99-101).

En relación a los hongos filamentosos aislados a partir de larvas alimentadas con la dieta GU, se reportó cepas de los géneros *Arthroderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* con actividades antibacterianas para el patógeno *S. aureus* ATCC 43300; mientras

que cepas de los géneros *Aspergillus*, *Scopulariopsis* y *Penicillium* mostraron actividad antimicrobiana contra el patógeno *S. Typhimurium* ATCC 13311. La actividad antibacteriana en hongos filamentosos ha sido más estudiada que las levaduras; es más, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son mundialmente conocidos por producir diversos metabolitos secundarios con comportamientos antibacterianos (102). En resumen, cepas del género *Aspergillus* de diversos orígenes pueden producir importantes productos naturales, como alcaloides, policétidos, terpenos y péptidos que tienen un amplio rango de actividad (103). Por otro lado cepas del género *Penicillium* ha tomado gran interés como fuente de nuevos compuestos desde su uso en la producción de la Penicilina, reportándose que dicho hongo no sólo puede producir moléculas activas como antibióticos sino también enzimas y ácidos orgánicos (104). Los géneros *Arthroderma*, *Ascosphaera* y *Scopulariopsis*, no son tan conocidos en el área antibiótica como los dos anteriores, y es por eso que no se han reportado estudios de inhibición bacteriana utilizando estas cepas.

Para el objetivo final de esta tesis se realizó una amplia búsqueda bibliográfica entre los géneros con mayor actividad antimicrobiana (*Arthroderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*) obviamente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* eran muy famosos por la producción de diversos metabolitos activos contra muchas bacterias (102); por lo que decidimos trabajar con la cepa de género *Arthroderma* (HGU11_8: *A. multifidum*) la cual era menos conocida y por lo tanto con compuestos activos menos estudiados. Además, los estudios del género *Arthroderma* se basan en sus antecedentes como hongo patógeno por lo que, los enfoques de su estudio van ligados a encontrar un antibiótico que lo pueda inhibir; mas no se le ha considerado

como productor de metabolitos antimicrobianos. Cabe mencionar que la cepa que aislamos e identificamos como *Arthroderma multifidum* (HGU11_8) no mostró un estadio teleomórfico en los cultivos realizados, sino que presentaba conidios pertenecientes a su anamorfo llamado *Chrysosporium multifidum*. La utilización de este estadio de la cepa nos permitió determinar su actividad antimicrobiana con diferentes métodos experimentales a partir del sobrenadante de su cultivo.

En nuestro caso, el extracto crudo de acetato de etilo del cultivo de la cepa fúngica HGU11_8 (Teleomorfo: *Arthroderma multifidum* / Anamorfo: *Chrysosporium multifidum*) mostró actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram positiva *S. aureus* ATCC 43300 con un MIC de 4 mg/mL, en cambio no mostró actividad contra la bacteria Gram negativa *S. Typhimurium* ATCC 13311. Como se mencionó anteriormente no se ha reportado la actividad antimicrobiana ni el MIC que presenta el extracto crudo de éste hongo, tampoco se sabe los comportamientos antimicrobianos que podrían tener las diferentes cepas fúngicas dentro del tracto digestivo de *H. illucens*. Sin embargo, existen reportes de diferentes hongos endófitos que presentan valores amplios de MIC contra la especie *S. aureus*. Sharma et al. reportaron que un hongo endófito identificado como *Pestalotiopsis neglecta* obtuvo un MIC de 12 mg/mL para *S. aureus* a partir del extracto crudo de su cultivo (105) e incluso otros hongos endófitos han mostrado valores más bajos como es el caso de *Nigrospora sphaerica*, cuyo extracto de acetato de etilo presentó un MIC de 0.39 mg/mL para la misma especie de patógeno (106), mientras que el extracto crudo de acetato de etilo de *Aspergillus fumigatus* presentó un MIC de 0.156 mg/mL(107); cabe mencionar que las cepas bacterianas patógenas utilizadas en estos estudios no presentan características de resistencia a la metilina por lo que

muy probablemente los MIC incrementarían al enfrentarla con una de estas cepas MRSA.

Al observar los valores de MIC obtenidos a partir de otros hongos filamentosos podemos recalcar que a pesar que nuestros valores de MIC son altos, no se encuentran fuera de los rangos anteriormente mencionados, por lo que no podríamos descartar su estudio a fondo. Por otro lado la mayoría de estudios reportados, se centran en brindar el MIC de los compuestos puros aislados a partir del extracto crudo de diferentes especies de hongos por lo que sus reportes no son comparables con los nuestros, sólo nos muestran que las cifras de MIC obtenidas son 300 a 250 veces menores a nuestros resultados (108).

La posible explicación sobre la inhibición bacteriana producida por el extracto crudo de *Arthroderma multifidum* hacia un patógeno gram positivo, se basa en la diferenciación de la cantidad de peptidoglicano que contiene una bacteria Gram negativa y Gram positiva. Las bacterias Gram positivas como *S. aureus* tienen altas proporciones de peptidoglicano como primera barrera, y por tanto son más propensas a los ataques de antibióticos que genera la destrucción de esta pared; por otro lado las bacterias Gram negativas como *S. Typhimurium* son más resistentes a los antibióticos de este tipo, ya que poseen adicionalmente una membrana externa que impide el acceso a ciertos compuestos (109). Por este motivo, podríamos sugerir que el extracto activo tiene algún compuesto con un mecanismo parecido a las penicilinas o cefalosporinas que involucran la inhibición de la síntesis del peptidoglicano; y que al ser encontrado en el sobrenadante del cultivo podemos confirmar que dicho compuesto es liberado extracelularmente.

Los reportes sobre la producción de metabolitos activos a partir del hongo en estadio teleomórfico y anamórfico nos mostraron que el estadio sexual identificado como *Arthroderma multifidum* no ha sido reportado como productor de metabolitos antimicrobianos, sin embargo, el estadio asexual de género *Chrysosporium* mostró diferentes reportes que no necesariamente pertenecen a la especie *C. multifidum* pero que sirven para darnos idea de las capacidades de producción de éste género. Entre ellos se menciona a la especie *Chrysosporium queenslandicum* como productor de la micotoxina Queenslandona encontrada en el caldo de cultivo del hongo y que mostró actividad antifúngica más no antibacteriana (110); así mismo fue reportada como productora de los compuestos Chrysoqueen y Chrysolandol que mostraron actividad contra bacterias Gram positivas y eran inactivas contra bacterias Gram negativas y hongos (111). Luego se reportó la producción de un análogo metilo de la Pestalona; sin embargo no se sabe si su actividad es tan eficiente como la misma Pestalona (112); adicionalmente se reportó la producción de un esterolesulfato muy relacionado con la Arundifungina llamada Sch 601324 con actividad antifúngica pero que no presentó actividad antibacteriana (113).

Los datos anteriormente mencionados, nos muestran que el género *Chrysosporium* tiene mucho potencial como productor de metabolitos activos, y que hasta el momento no se le ha dado la debida importancia. Nuestros resultados pueden ser ese primer paso para poder iniciar el estudio de esta especie como productora de metabolitos activos contra *S. aureus* ATCC 43300.

Los resultados obtenidos en este estudio no sólo benefician el incremento del conocimiento de la microbiota dentro del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens* sino que además la presenta como un insecto que pese a su dieta puede

seleccionar microorganismos benéficos con actividades antimicrobianas y que pueden resultar atractivas para las industrias que actualmente se encuentran en miras a utilizarlas. Cabe mencionar que dicha larva es una de las mejores opciones para ser utilizada como harina para la alimentación de animales de granja y peces, ya que cuenta con altos contenidos de grasas y proteínas (114, 115) semejantes a las harinas de pescado y soya. El efecto antibiótico que muestra su microbiota intestinal y que se ha confirmado en este estudio, le ofrece simultáneamente un beneficio extra como un reservorio probiótico. Ayudando a disminuir los costos de las agroindustrias en uso de antibióticos comerciales que tienden a dejar trazas y generan la selección de cepas microbianas resistentes.

10. CONCLUSIONES

- Se aisló 14 y 25 cepas de hongos provenientes del tracto intestinal de larvas alimentadas con alimento comercial para aves (GS) y con guano de gallina (GU) respectivamente.
- Las cepas provenientes de la primera población de larvas (dieta GS) fueron identificadas como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Pichia kudriavzevii*; las cepas de la segunda población de larvas (dieta GU) fueron identificadas como *Candida pseudorugosa*, *Pichia kudriavzevii*, *Stephanoascus ciferrii*, cepas no clasificadas de Trichosporonales, *Arthroderma multifidum*, *Ascospaera variegata*, *Aspergillus* sp., *Penicillium janthinellum* y *Scopulariopsis brevicaulis*.
- Las especies activas contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 fueron *Candida pseudorugosa*, *Stephanoascus ciferrii*, cepas de Trichosporonales no identificadas, *Arthroderma multifidum*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium janthinellum*, mientras que las especies activas contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. *Typhimurium* ATCC 13311 fueron *Candida glabrata* y *Pichia kudriavzevii*, *Aspergillus* sp., *Penicillium janthinellum* y *Scopulariopsis brevicaulis*.
- La actividad antimicrobiana a partir del extracto crudo de acetato de etilo proveniente del cultivo líquido del hongo HGU11_8, identificado como *Arthroderma multifidum* y presente en su estadio anamórfico (*Chrysosporium multifidum*), mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 con un valor de IC50 de 1.6 ± 0.16 mg/mL y con un MIC de 4 mg/mL.

11. RECOMENDACIONES

- Para complementar, se debe realizar el aislamiento e identificación de hongos provenientes del tracto digestivo de *H. illucens* en los diferentes estadios larvales, para observar si fluctúa o no a través del tiempo.
- Tratar de iniciar el aislamiento de microorganismos fúngicos no cultivables provenientes del tracto digestivo de larvas de *H. illucens* utilizando técnicas que asemejen las condiciones del intestino y explorar la producción de los posibles nuevos metabolitos que podrían ser producidos.
- Se recomienda además, realizar la amplificación y secuenciamiento de ADN fúngico utilizando otros genes de referencia adicionales para poder obtener una identificación más certera de las cepas fúngicas filamentosas obtenidas a partir del tracto digestivo de la larva de BSF.
- Con respecto al extracto del cultivo del hongo HGU11_8, se recomienda separar la banda activa mostrada en el perfil del extracto crudo, utilizando solventes que permitan obtenerla de manera pura, para poder realizar su identificación. Una vez obtenido el compuesto se deberá determinar el IC50 y MIC para comparar su actividad con otros compuestos provenientes de diferentes fuentes microbianas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*. 2012;65(8):385.
2. Choi WH, Yun JH, Chu JP, Chu KB. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram- negative bacteria. *Entomological research*. 2012;42(5):219-26.
3. Liu Q, Tomberlin JK, Brady JA, Sanford MR, Yu Z. Black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae reduce *Escherichia coli* in dairy manure. *Environmental entomology*. 2008;37(6):1525-30.
4. Jeon H, Park S, Choi J, Jeong G, Lee S-B, Choi Y, et al. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Current microbiology*. 2011;62(5):1390-9.
5. Lee JK, Lee YY, Park KH, Sim J, Choi Y, Lee S-J. *Wohlfahrtiimonas larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014;105(1):15-21.
6. Lee YY, Lee JK, Park KH, Kim S-Y, Roh SW, Lee S-B, et al. *Paenalcaligenes hermetiae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), and emended description of the genus *Paenalcaligenes*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013;63(11):4224-9.
7. Kavanagh K. *Fungi: biology and applications*. 3rd edition ed: John Wiley & Sons; 2017.

8. Moore D, Robson GD, Trinci AP. 21st century guidebook to fungi Cambridge University Press; 2011.
9. Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, Schroeckh V, et al. Regulation and role of fungal secondary metabolites. Annual review of genetics. 2016;50:371-92.
10. Demain AL, Elander RP. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie Van Leeuwenhoek. 1999;75(1-2):5-19.
11. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance: World Health Organization; 2014.
12. Denegrit A, Drouilly A. Infeccion intrahospitalaria y contaminacion por via aerea. Rev méd Chile. 1981;109(12):1235-9.
13. M. GDd. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Revista chilena de infectología. 2000;17:145-52.
14. García Apac C. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta medica peruana. 2012;29(2):99-103.
15. de Freitas Neto O, Penha Filho R, Barrow P, Berchieri Junior A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 2010;12(1):01-11.
16. Fernandes P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? Nature biotechnology. 2006;24(12):1497-503.
17. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. Nature reviews Drug discovery. 2013;12(5):371-87.
18. Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S, et al. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of $a < 500\text{Da}$

- fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes and Infection*. 2008;10(4):325-33.
19. Erickson MC, Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle MP. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *Journal of food protection*. 2004;67(4):685-90.
 20. Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology today*. 1992;13(10):411-5.
 21. Diener S, Zurbrügg C, Tockner K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research*. 2009;27(6):603-10.
 22. Myers HM, Tomberlin JK, Lambert BD, Kattes D. Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure. *Environmental Entomology*. 2008;37(1):11-5.
 23. Caruso D, Devic E, Subamia I, Talamond P, Baras E. Technical handbook of domestication and production of Diptera Black Soldier Fly (BSF), *Hermetia illucens*, Stratiomyidae. 2014.
 24. Wang Y-S, Shelomi M. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. *Foods*. 2017;6(10):91.
 25. Roh SW, Nam Y-D, Chang H-W, Kim K-H, Kim M-S, Ryu J-H, et al. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(20):6171-7.

26. Yu H, Wang Z, Liu L, Xia Y, Cao Y, Yin Y. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current microbiology*. 2008;56(4):391-6.
27. Suh SO, Marshall CJ, Mchugh JV, Blackwell M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose- fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*. 2003;12(11):3137-45.
28. Suh S-O, McHugh JV, Blackwell M. Expansion of the *Candida tanzawaensis* yeast clade: 16 novel *Candida* species from basidiocarp-feeding beetles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54(6):2409-29.
29. Suh S-O, McHUGH JV, Pollock DD, Blackwell M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological research*. 2005;109(3):261-5.
30. Amat-García EC, Amat-García GD, Henao-M LG. Diversidad taxonómica y ecológica de la entomofauna micófaga en un bosque altoandino de la cordillera oriental de Colombia. *Ecología*. 2004;28:223-31.
31. Begon M, Townsend CRH, John L, Colin RT, John LH. *Ecology: from individuals to ecosystems* 2006.
32. Boekhout T. Biodiversity: gut feeling for yeasts. *Nature*. 2005;434(7032):449-51.
33. Hayashi A, Aoyagi H, Yoshimura T, Tanaka H. Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2007;103(4):358-67.

34. Donovan S, Purdy K, Kane M, Eggleton P. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(7):3884-92.
35. Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, Watanabe Y. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007;71(4):906-15.
36. Park S-I, Kim J-W, Yoe SM. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Developmental & Comparative Immunology*. 2015;52(1):98-106.
37. Tobias NJ. Insect Vectors of Disease: Untapped Reservoirs for New Antimicrobials? *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2085.
38. Deacon JW. *Fungal biology*. 4th edition ed: John Wiley & Sons; 2006.
39. Webster J, Weber R. *Introduction to Fungi* Cambridge Univ. Press, UK. 2007.
40. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:421.
41. Arenas Guzmán R. *Micología: médica ilustrada*: Mc Graw Hill; 2008.
42. Watkinson SC, Boddy L, Money N. *The fungi*: Academic Press; 2015.
43. Kagan BL. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*. 1983;302(5910):709-11.

44. Polak-Berecka M, Wasiko A, Koston D, editors. Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*; 2009: De Gruyter Open Sp. z oo.
45. Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Proksch P. Co-cultivation—A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*. 2014;12(2):1043-65.
46. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*. 1976;40(3):722.
47. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, et al. Conducting a microbiome study. *Cell*. 2014;158(2):250-62.
48. Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950;42(2):265-70.
49. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina. 2003;118.
50. Ellis MB, Ellis JP. Microfungi on miscellaneous substrates: an identification handbook: Croom Helm; 1988.
51. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species: CRC press; 2010.
52. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990;18(1):315-22.

53. Strus M. A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*. 1998;50(1-2):123-30.
54. Pereira E, Santos A, Reis F, Tavares RM, Baptista P, Lino-Neto T, et al. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological research*. 2013;168(1):1-5.
55. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural products isolation*: Springer Science & Business Media; 2005.
56. Rahalison IL, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical analysis*. 1991;2(5):199-203.
57. Zgoda JR, Porter JR. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology*. 2001;39(3):221-5.
58. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008;3(2):163.
59. Varotto Bocazzi I, Ottoboni M, Martin E, Comandatore F, Vallone L, Spranghers T, et al. A survey of the mycobiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *PloS one*. 2017;12(8):e0182533.
60. Carlotti A, Couble A, Domingo J, Miroy K, Villard J. Species-specific identification of *Candida krusei* by hybridization with the CkF1, 2 DNA probe. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(7):1726-31.

61. Kurtzman C, Smiley M, Johnson C. Emendation of the genus *Issatchenkia* *Kudriavzev* and comparison of species by deoxyribonucleic acid reassociation, mating reaction, and ascospore ultrastructure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1980;30(2):503-13.
62. Piper AM, Farnier K, Linder T, Speight R, Cunningham JP. Two gut-associated yeasts in a tephritid fruit fly have contrasting effects on adult attraction and larval survival. *Journal of chemical ecology*. 2017;43(9):891-901.
63. Stefanini I. Yeast- insect associations: It takes guts. *Yeast*. 2018;35:315-30.
64. Suh S-O, Nguyen NH, Blackwell M. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS yeast research*. 2007;8(1):88-102.
65. Allimuthu V. Implication of fungal growth in poultry management and biogas production. 2015.
66. Khunnamwong P, Lertwattanasakul N, Jindamorakot S, Limtong S, Lachance M-A. Description of *Diutina* gen. nov., *Diutina siamensis*, fa sp. nov., and reassignment of *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzettiae* to the genus *Diutina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2015;65(12):4701-9.
67. Chabasse D, Guiguen C, Couatarmanac'h A, Launay H, Reece V, De Bièvre C. Contribution à la connaissance de la flore fongique kératinophile isolée des petits Mammifères sauvages et du lapin de garenne en France-Discussion sur

- les espèces fongiques rencontrées. *Annales de parasitologie humaine et comparée*. 1987;62(4):357-68.
68. Metin B, Heitman J. Sexual reproduction in dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017;182(1-2):45-55.
 69. Douglas A, Smith D. Are endosymbioses mutualistic? *Trends in Ecology & Evolution*. 1989;4(11):350-2.
 70. Franck A, De Leenheer L. Polysaccharides. II. Polysaccharides from eukaryotes. *Biopolymers*. 2002;6:439-79.
 71. Turunen S. 6 - Absorption A2 - KERKUT, G.A. In: Gilbert LI, editor. *Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion*. Amsterdam: Pergamon; 1985. p. 241-77.
 72. Vega FE, Blackwell M. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*: Oxford University Press; 2005.
 73. Starmer WT, Fogleman JC. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. *Journal of Chemical Ecology*. 1986;12(5):1037-55.
 74. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(5):699-735.
 75. Witzgall P, Proffit M, Rozpedowska E, Becher PG, Andreadis S, Coracini M, et al. “This is not an apple”—yeast mutualism in codling moth. *Journal of chemical ecology*. 2012;38(8):949-57.
 76. Cooke R. *The biology of symbiotic fungi*: John Wiley and Sons.; 1977.
 77. Gilbert DG. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*. 1980;46(1):135-7.

78. Morais PB, Rosa CA, Hagler AN, Mendonca-Hagler LC. Yeast communities of the cactus *Pilosocereus arrabidae* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1994;66(4):313-7.
79. Moubasher A, Abdel-Sater M, Soliman Z. Yeasts and filamentous fungi inhabiting guts of three insect species in Assiut, Egypt. *Mycosphere*. 2017;8(9):1297-316.
80. Beaver R, Wilding N, Collins N, Hammond P, Webber J. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. *Insect-fungus interactions*. 1989:121-43.
81. Stone W, Nebeker T, Monroe W. Ultrastructure of the mesonotal mycangium of *Xylosandrus mutilatus* (Blandford), an exotic ambrosia beetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) by light, scanning, and transmission electron microscopy. *MICROSCOPY AND MICROANALYSIS-NEW YORK*-. 2005;11:172.
82. Rolhion N, Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Phil Trans R Soc B*. 2016;371(1707):20150504.
83. Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & translational immunology*. 2017;6(2).
84. Muccilli S, Restuccia C. Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*. 2015;3(4):588-611.
85. Hayduck F. Uber einen Hefengiftstoff in Hefe. *Wochenschr Brau*. 1909;26:677-9.
86. Younis G, Awad A, Dawod RE, Yousef NE. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary world*. 2017;10(8):979.

87. Bajaj BK, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*. 2013;53(8):645-56.
88. Chelliah R, Ramakrishnan SR, Prabhu PR, Antony U. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild- strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*. 2016;33(8):385-401.
89. Waema S, Maneesri J, Masniyom P. Isolation and identification of killer yeast from fermented vegetables. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2009;2(4):126-34.
90. Acuña-Fontecilla A, Silva-Moreno E, Ganga MA, Godoy L. Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CyTA-Journal of Food*. 2017;15(3):457-65.
91. Braga-Silva L, Mesquita D, Ribeiro M, Carvalho S, Fracalanza S, Santos A. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;42(8):765-70.
92. Zomorodian K, Bandegani A, Mirhendi H, Pakshir K, Alinejhad N, Fard AP. In vitro susceptibility and trailing growth effect of clinical isolates of *Candida* species to azole drugs. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016;9(2).
93. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(5):1647-51.


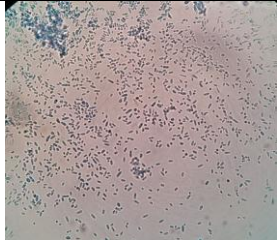
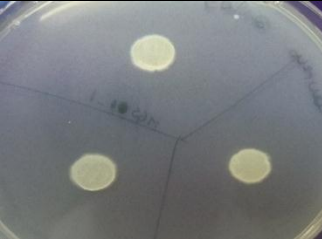
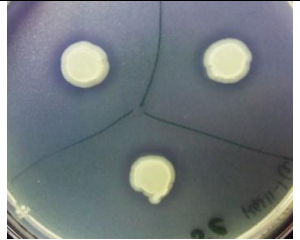
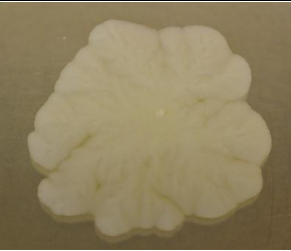
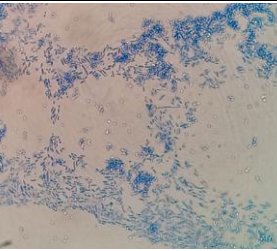



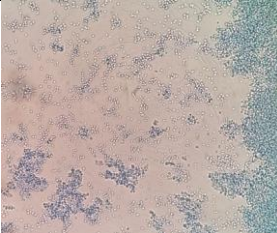


94. Lim S, Tay S. Research Note Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical biomedicine*. 2011;28(2):438-43.
95. Periasamy M, Trueman P, Adhimani A, Sathaiah G, Ravichandran K, Kedare M, et al. Isolation of Pathogenic Bacteria from Poultry Wastages at Chennai Suburban. *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*. 2013;6(6):50-4.
96. Lu J, Sanchez S, Hofacre C, Maurer JJ, Harmon BG, Lee MD. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(2):901-8.
97. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*. 2007;23(6):679-92.
98. Syal P, Vohra A. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*. 2013;5(2):390.
99. Czerucka D, Piche T, Rampal P. yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;26(6):767-78.
100. Martins FS, Elian SD, Vieira AT, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, et al. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301(4):359-64.


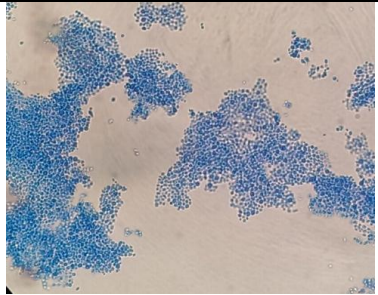

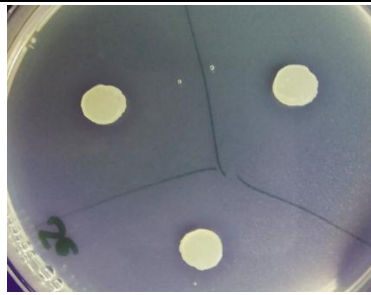
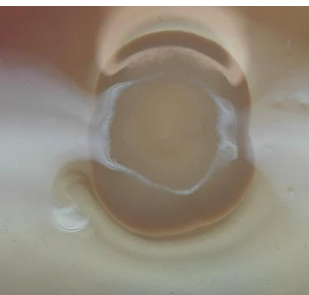
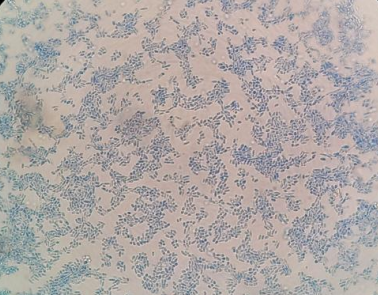



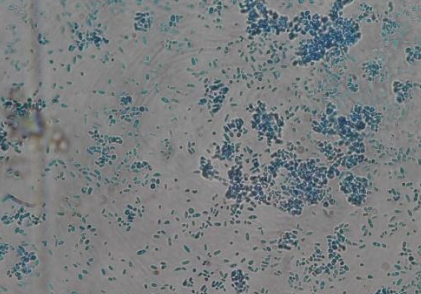


101. Tiago FdCP, Martins FdS, Souza ÉLdS, Pimenta PFP, Araújo HRCd, Castro IdM, et al. Adhesion on yeast cell surface as a trapping mechanism of pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. 2012.
102. Bräse S, Encinas A, Keck J, Nising CF. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical reviews*. 2009;109(9):3903-90.
103. An X, Pei Y, Chen S, Li S, Hu X, Chen G, et al. Three New Butenolides from the Fungus *Aspergillus* sp. CBS-P-2. *Molecules*. 2016;21(10):1361.
104. Petit P, Lucas EM, Abreu LM, Pfenning LH, Takahashi JA. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2009;12(4):8-9.
105. Sharma D, Pramanik A, Agrawal PK. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech*. 2016;6(2):210.
106. Santos IPd, Silva LCNd, Silva MVd, Araújo JMd, Cavalcanti MdS, Lima VLdM. Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in microbiology*. 2015;6:350.
107. Mahadevamurthy M, Puttaswamy H, Thriveni M, Sidappa M, Madegowda P, Jayaramu S, et al. Antibacterial potential of fungal endophytes isolated from *Boerhaavia diffusa* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(10):216-21.
108. Ratnaweera PB, de Silva ED, Williams DE, Andersen RJ. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):220.

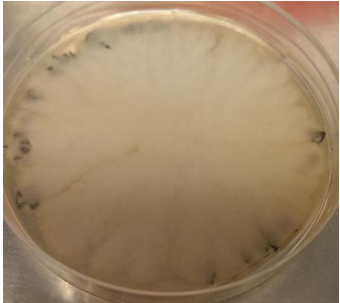
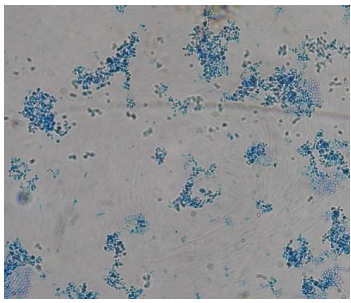



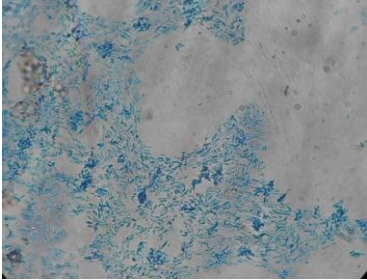
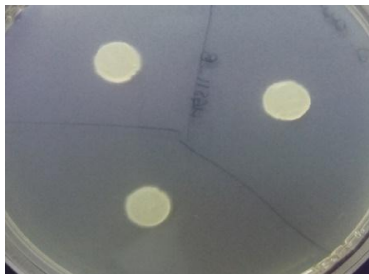
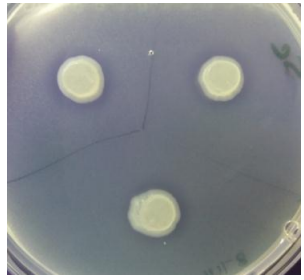
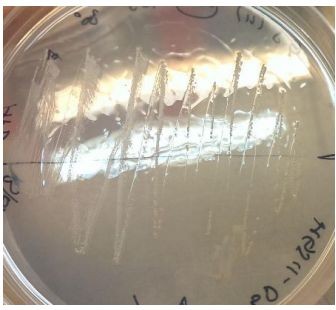
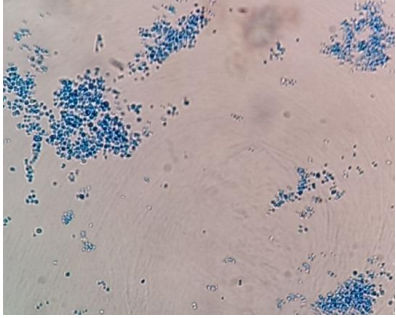

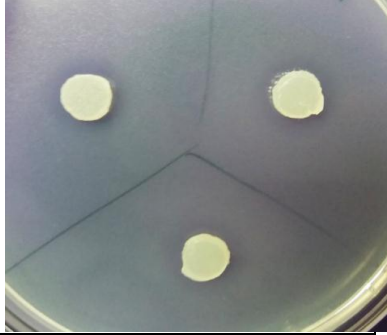
109. Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 2016;1858(5):980-7.
110. Hoshino Y, Ivanova VB, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Zaki SM, et al. Queenslondon, a new antifungal compound produced by *Chrysosporium queenslandicum*: production, isolation and structure elucidation. *The Journal of antibiotics*. 2002;55(5):516-9.
111. Ivanova VB, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Zaki SM, et al. Isolation and structure elucidation of two new antibacterial compounds produced by *Chrysosporium queenslandicum*. *The Journal of antibiotics*. 2002;55(10):914-8.
112. Iijima D, Tanaka D, Hamada M, Ogamino T, Ishikawa Y, Nishiyama S. The first total synthesis of SB87-Cl and pestalone, novel bioactive benzophenone natural products. *Tetrahedron letters*. 2004;45(28):5469-71.
113. Yang S-W, Buevich A, Chan T-M, Terracciano J, Chen G, Loebenberg D, et al. A new antifungal sterol sulfate, sch 601324, from *Chrysosporium* sp. *The Journal of antibiotics*. 2003;56(4):419-22.
114. Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*. 2002;39(4):695-8.
115. Tomberlin JK, Sheppard DC. Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a colony. *Journal of Entomological Science*. 2002;37(4):345-52.


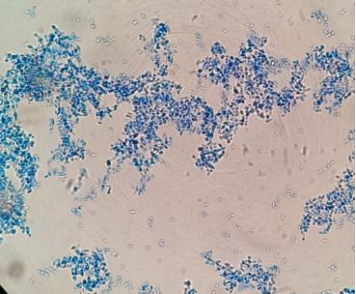
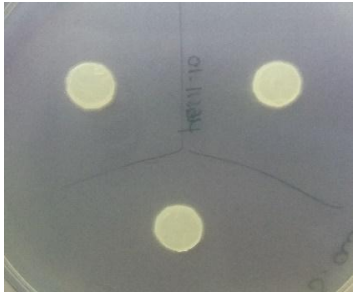






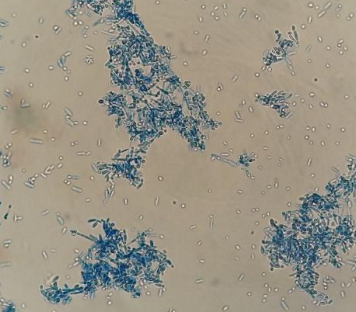
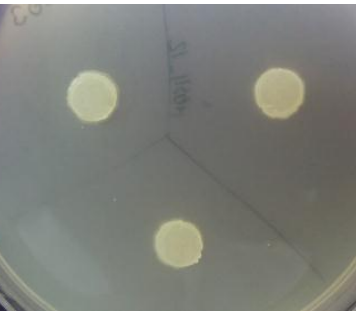

13. ANEXOS


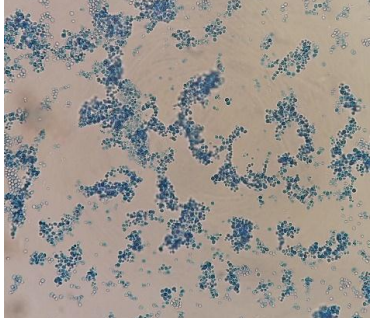
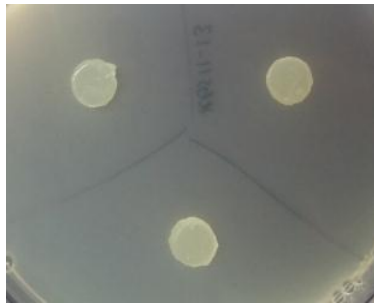
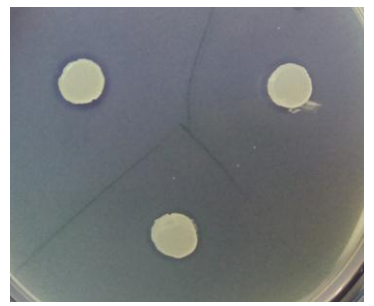

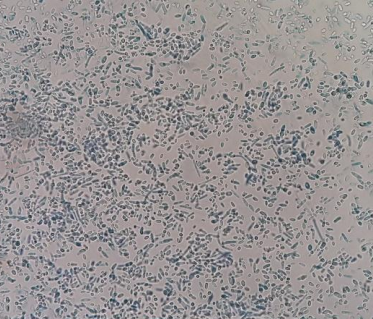

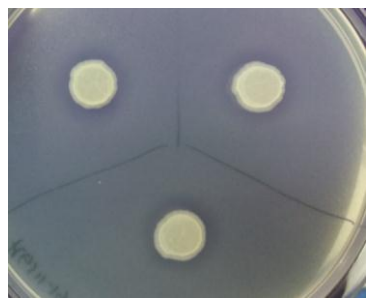
Anexo N° 1: Visualización Macro y microscópica de las cepas fúngicas provenientes del tracto intestinal de larvas alimentadas con GS y los resultados de su enfrentamiento contra *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311.

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGS11_1				
HGS11_2				
HGS11_3				


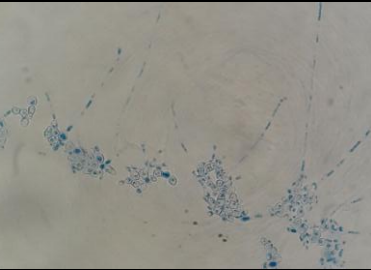
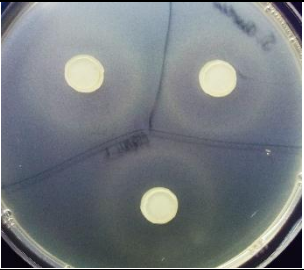
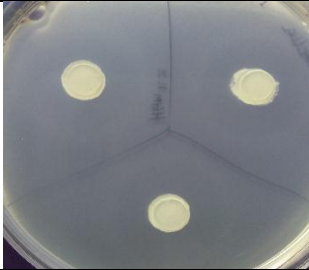

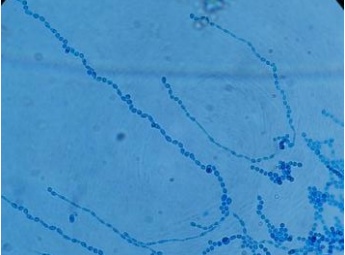



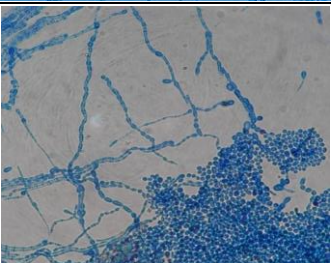
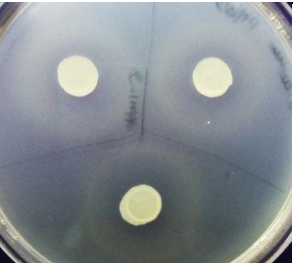

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGS11_4				
HGS11_5				
HGS11_6				


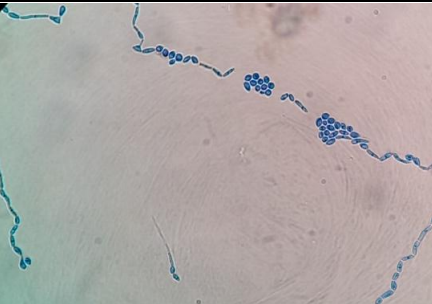
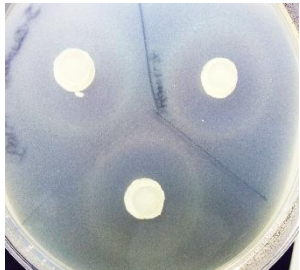


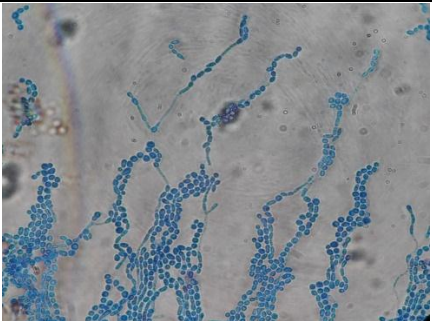

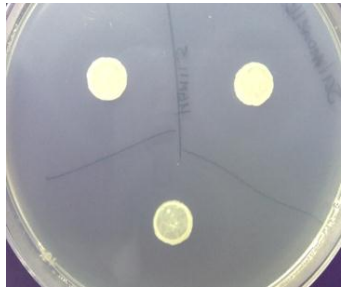



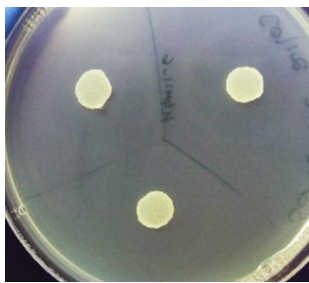
CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGS11_7				
HGS11_8				
HGS11_9				


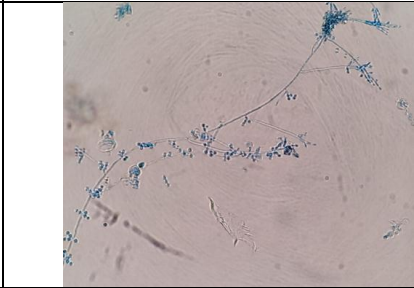
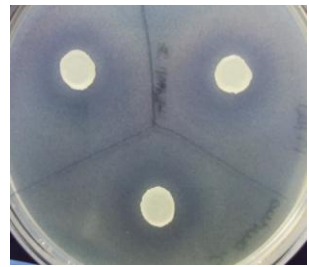
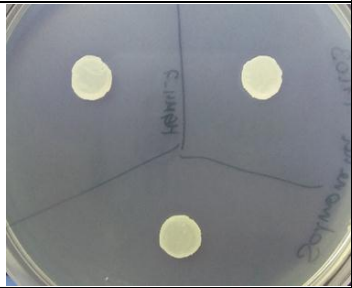

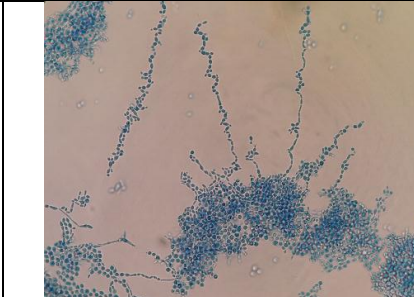
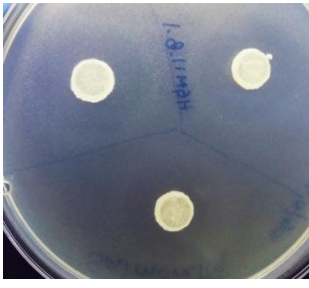


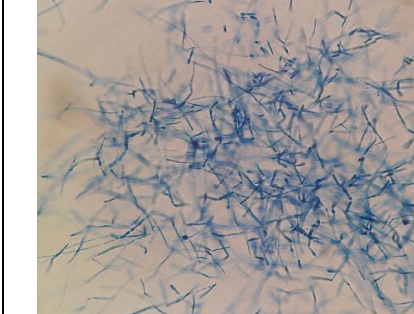
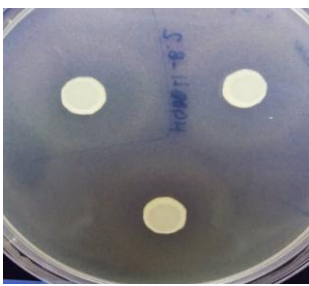
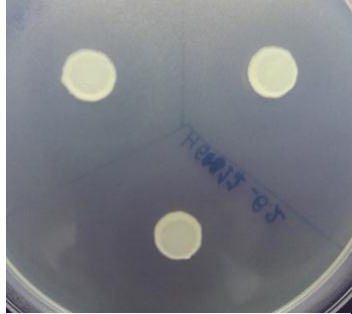
CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGS11_10				
HGS11_11				
HGS11_12				


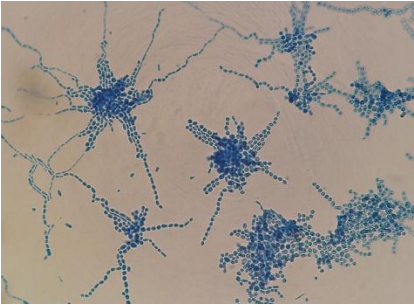
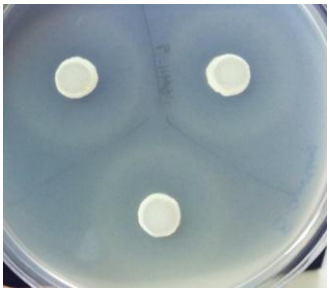


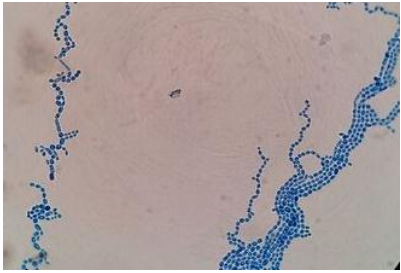

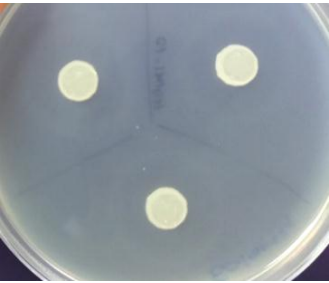

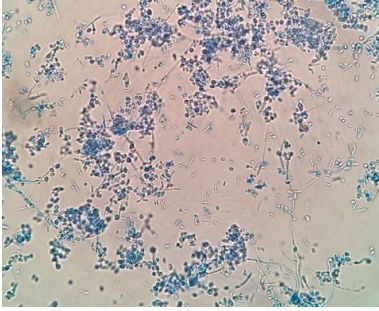
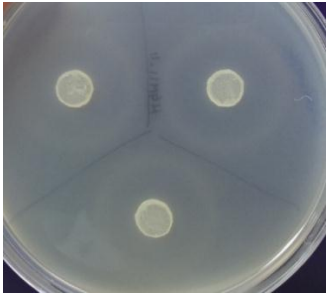

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGS11_13				
HGS11_14				


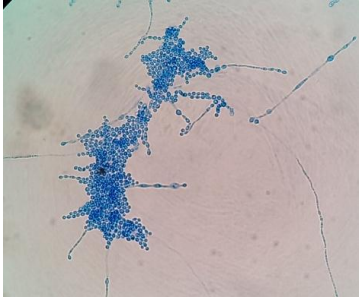
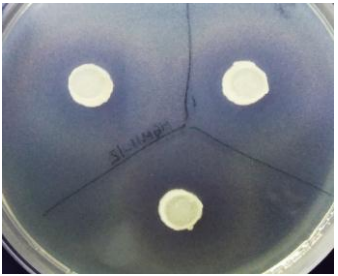
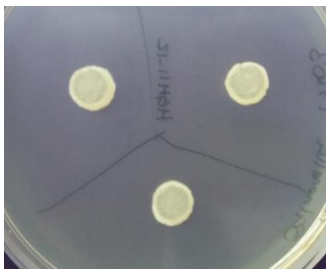

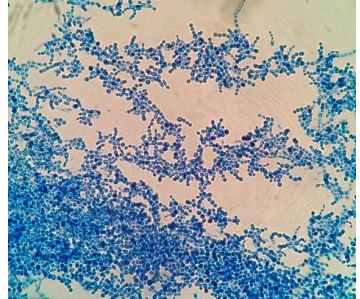
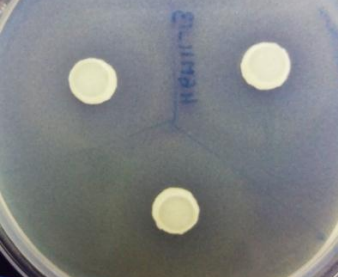
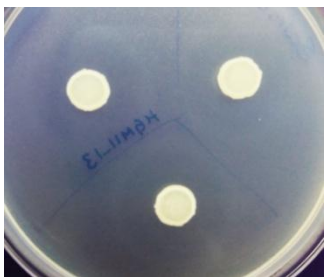

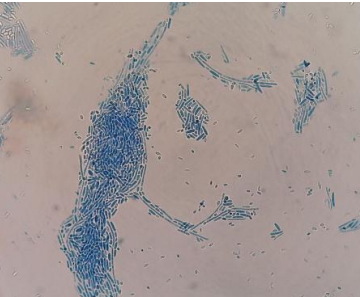
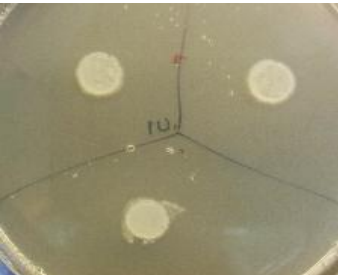

Anexo N° 2: Visualización Macro y microscópica de las cepas fúngicas levaduriformes provenientes del tracto intestinal de larvas alimentadas con GU y los resultados de su enfrentamiento contra *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311.

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGM11_1				
HGM11_1				
HGM11_3				

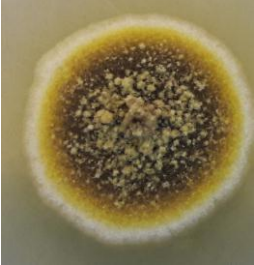
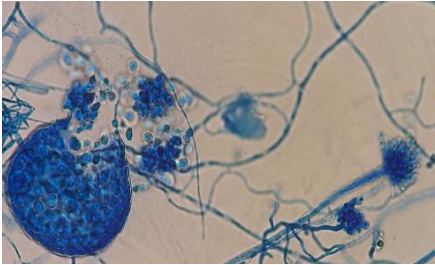

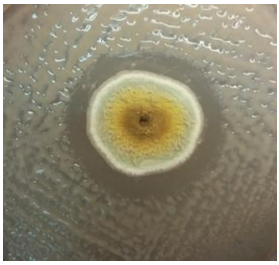

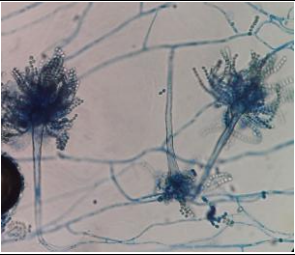
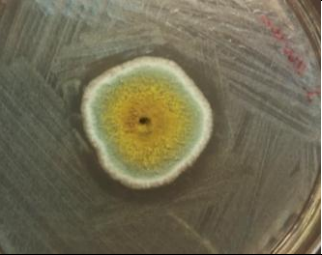



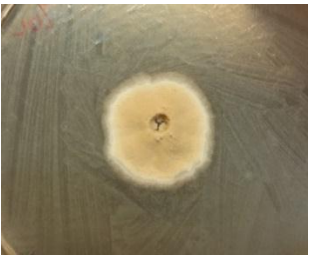

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGM11_4				
HGM11_5				
HGM11_6				


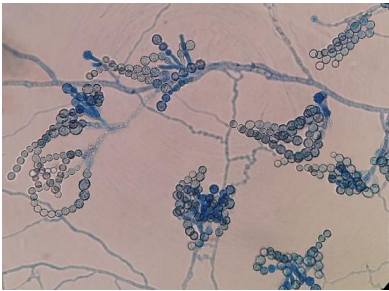







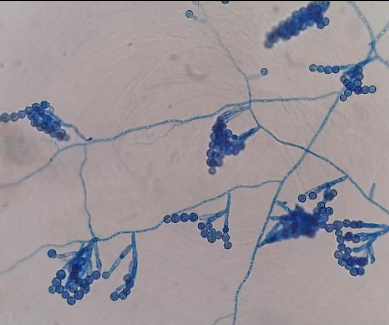


CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGM11_7				
HGM11_8.1				
HGM11_8.2				

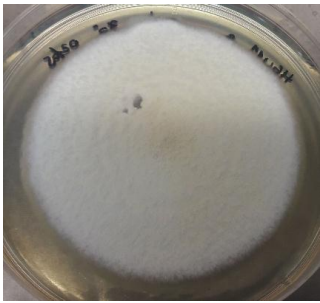
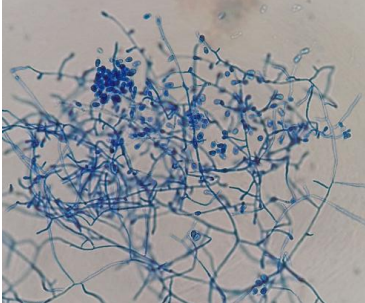



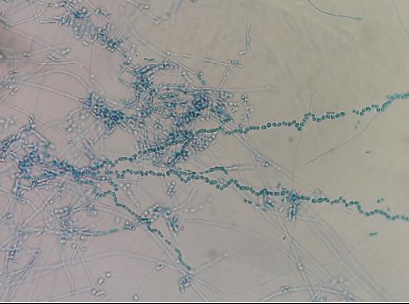
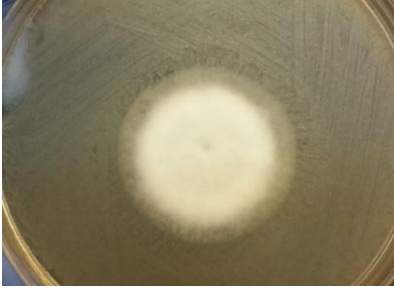
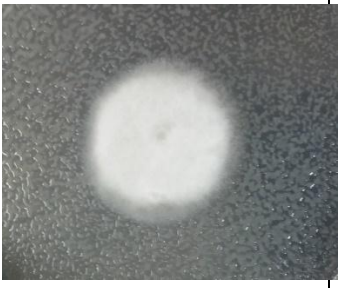

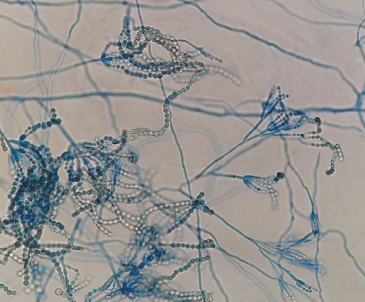


CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGM11_9				
HGM11_10				
HGM11_11				




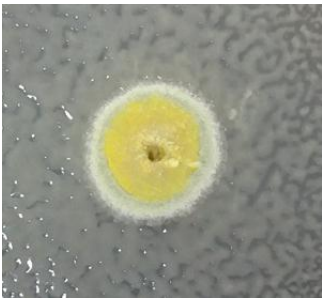
CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGM11_12				
HGS11_13				
HGU11_1				

Anexo N° 3: Visualización Macro y microscópica de las cepas fúngicas levaduriformes provenientes del tracto intestinal de larvas alimentadas con GU y los resultados de su enfrentamiento contra *S. aureus* ATCC 43300 y *S. Typhimurium* ATCC 13311.

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400 X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGU11_2				
HGU11_3				
HGU11_4				

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGU11_5				
HGU11_6				
HGU11_7				

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGU11_8				
HGU11_9				
HGU11_10				

CÓDIGO DE CEPA	VISUALIZACIÓN MACROSCÓPICA	VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA (400X)	PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA	
			<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311
HGU11_11				

Anexo N° 4: Resultados de las pruebas de antagonismo de cepas levaduriformes aisladas a partir de larvas alimentadas con GS contra patógenos microbianos ATCC. Los valores están expresados con el promedio de tres repeticiones \pm error estándar.

Cepas Levaduriformes	Identificación Molecular	Pruebas de antagonismo contra:							
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300				<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311			
		Claridad del Halo	Diámetro de inhibición (mm)	Diámetro de la levadura (mm)	Potencial antimicrobiano	Claridad del Halo	Diámetro de inhibición (mm)	Diámetro de la levadura (mm)	Potencial antimicrobiano
HGS11_1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(++)	15.0 \pm 0.00	8	1.88 \pm 0.00
HGS11_2	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(++)	14.5 \pm 0.39	8	1.81 \pm 0.06
HGS11_3	<i>Candida glabrata</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	12.0 \pm 0.00	8	1.50 \pm 0.00
HGS11_4	<i>Candida glabrata</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	12.0 \pm 0.45	8	1.50 \pm 0.04
HGS11_5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	13.7 \pm 0.37	8	1.71 \pm 0.04
HGS11_6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	14.2 \pm 0.70	8	1.77 \pm 0.10
HGS11_7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(++)	15.3 \pm 0.37	8	1.92 \pm 0.00
HGS11_8	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	14.8 \pm 0.29	8	1.85 \pm 0.02
HGS11_9	<i>Candida glabrata</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	12.7 \pm 0.86	8	1.58 \pm 0.13
HGS11_10	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	15.3 \pm 0.37	8	1.92 \pm 0.04
HGS11_11	<i>Candida tropicalis</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGS11_12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(++)	14.2 \pm 0.70	8	1.77 \pm 0.10
HGS11_13	<i>Candida glabrata</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	12.0 \pm 0.63	8	1.50 \pm 0.08
HGS11_14	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(+)	14.5 \pm 0.39	8	1.81 \pm 0.02
Tetraciclina		(+++)	25 \pm 1.26	8	3.17 \pm 0.18	(+++)	21 \pm 0.87	8	2.63 \pm 0.13

Anexo N° 5: Resultados de las pruebas de antagonismo utilizando el cocultivo de cepas levaduriformes aisladas a partir de larvas alimentadas con GU contra patógenos microbianos ATCC. Los valores están expresados con el promedio de tres repeticiones \pm error estándar.

Cepas Levaduriformes	Identificación molecular	Pruebas de antagonismo contra:							
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300				<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311			
		Claridad del Halo	Diámetro de inhibición (mm)	Diámetro de la levadura (mm)	Potencial antimicrobiano	Claridad del Halo	Diámetro de inhibición (mm)	Diámetro de la levadura (mm)	Potencial antimicrobiano
HGM11_1	Trichosporonales no clasificado	(+)	22 \pm 0.90	8	2.78 \pm 0.12	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_2	Trichosporonales no clasificado	(+)	23 \pm 1.37	8	2.89 \pm 0.20	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_3	Trichosporonales no clasificado	(+)	17 \pm 1.56	8	2.07 \pm 0.22	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_4	Trichosporonales no clasificado	(+)	23 \pm 1.35	8	2.88 \pm 0.19	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_5	Trichosporonales no clasificado	(+)	22 \pm 0.81	8	2.72 \pm 0.11	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_6	<i>Stephanoascus ciferrii</i>	(+)	23 \pm 1.07	8	2.90 \pm 0.15	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_7	<i>Stephanoascus ciferrii</i>	(+)	21 \pm 0.19	8	2.61 \pm 0.01	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_8.1	Trichosporonales no clasificado	(+)	22 \pm 0.63	8	2.72 \pm 0.07	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_8.2	Trichosporonales no clasificado	(+)	22 \pm 0.77	8	2.81 \pm 0.11	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_9	Trichosporonales no clasificado	(+)	21 \pm 0.56	8	2.65 \pm 0.08	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_10	Trichosporonales no clasificado	(+)	21 \pm 0.50	8	2.67 \pm 0.06	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_11	Trichosporonales no clasificado	(+)	23 \pm 0.65	8	2.93 \pm 0.09	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_12	Trichosporonales no clasificado	(+)	18 \pm 1.54	8	2.26 \pm 0.20	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGM11_13	<i>Candida pseudorugosa</i>	(+)	19 \pm 2.21	8	2.36 \pm 0.31	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00
HGU11_1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	8 \pm 0.00	8	1 \pm 0.00	(++)	14 \pm 0.48	8	1.72 \pm 0.05
Tetraciclina		(+++)	25 \pm 1.26	8	3.17 \pm 0.18	(+++)	21 \pm 0.87	8	2.63 \pm 0.13

Anexo N° 6: Resultados de las pruebas de antagonismo utilizando el cocultivo de cepas filamentosas aisladas a partir de larvas alimentadas con GU contra patógenos microbianos ATCC. Los valores están expresados con el promedio de tres repeticiones \pm error estándar.

Cepas Filamentosas	Identificación molecular	Pruebas de antagonismo contra:					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300			<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311		
		Diámetro del Hongo (mm)	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano (mm)	Diámetro del Hongo (mm)	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano (mm)
HGU11_2	<i>Aspergillus</i> sp.	27.0 \pm 0.0	29.0 \pm 0.0	1.07 \pm 0.00	25.7 \pm 1.3	30.3 \pm 1.8	1.18 \pm 0.02
HGU11_3	<i>Aspergillus</i> sp.	28.7 \pm 0.7	34.0 \pm 0.0	1.19 \pm 0.03	28.0 \pm 1.2	34.0 \pm 1.2	1.22 \pm 0.01
HGU11_4	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	22.7 \pm 1.3	22.7 \pm 1.3	1 \pm 0.00	20.0 \pm 1.6	20.0 \pm 1.6	1 \pm 0.00
HGU11_5	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	19.3 \pm 2.8	19.3 \pm 2.8	1 \pm 0.00	21.0 \pm 3.3	21.0 \pm 3.3	1 \pm 0.00
HGU11_6	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	24.7 \pm 2.8	24.7 \pm 2.8	1 \pm 0.00	26.0 \pm 3.5	31.5 \pm 0.4	1.07 \pm 0.00
HGU11_7	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	19.7 \pm 0.3	19.7 \pm 0.3	1 \pm 0.00	21.3 \pm 2.0	27.0 \pm 1.6	1.18 \pm 0.02
HGU11_8	<i>Arthroderma multifidum</i>	36.7 \pm 0.9	52.0 \pm 2.1	1.42 \pm 0.03	39.0 \pm 0.6	39.0 \pm 0.6	1 \pm 0.00
HGU11_9	<i>Ascosphaera variegata</i>	36.3 \pm 0.9	36.3 \pm 0.9	1 \pm 0.00	32.0 \pm 0.8	32.0 \pm 0.8	1 \pm 0.00
HGU11_10	<i>Penicillium janthinellum</i>	33.0 \pm 0.6	49.0 \pm 0.6	1.49 \pm 0.01	34.0 \pm 1.0	40.0 \pm 1.0	1.18 \pm 0.01
HGU11_11	<i>Aspergillus</i> sp.	27.3 \pm 0.3	27.3 \pm 0.3	1 \pm 0.00	24.0 \pm 3.0	24.0 \pm 3.0	1 \pm 0.00
Tetraciclina		8 \pm 0.0	25 \pm 1.26	3.17 \pm 0.18	8 \pm 0.0	21 \pm 0.87	2.63 \pm 0.13