



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS NATURALES ACTIVOS
CONTRA *Aeromonas hydrophila* A
PARTIR DE LA MICROBIOTA DE
Hermetia illucens”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA

DENIS HELAN CASTILLO PAREJA

LIMA - PERÚ

2023

ASESOR DE TESIS

DR. MICHEL HENRI AUGUSTE SAUVAIN

JURADO DE TESIS

DR. GUSTAVO FRANCISCO GONZALES RENGIFO

PRESIDENTE

DR. PEDRO ALEJANDRO ORIHUELA DIAZ

VOCAL

DRA. MELISSA MARLENE MÉNDEZ ARANDA

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mi esposa y a mis bellos hijos Mathías Alexander, Stephanía Larissa y María Fernanda, quienes me impulsan a seguir mejorando como esposo, padre y científico.

A mis padres Teófila y José y a mis queridos hermanos y hermanas quienes siempre me han apoyado desde que tengo recuerdos de ellos.

AGRADECIMIENTOS

A mi amigo, el Dr. Michel Sauvain, director del Laboratorio de Química de la Vida (LaVi) por su inagotable paciencia y confianza para trabajar con su equipo de investigación.

Al Dr. Billy Cabanillas por el apoyo en la caracterización preliminar de compuestos aislados del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*.

A mis amigos Mishel Landa, Mario Ruiz y Álvaro Díaz por su constante apoyo y buen ánimo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO


D. H. Castillo Pareja reconoce el apoyo financiero del Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [08-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales].


Así mismo, agradezco la financiación recibida por el Laboratorio de Química de la Vida (LaVi) creado mediante un convenio realizado entre la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) de Francia.

DENIS HELAN CASTILLO PAREJA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES ACTIVOS CONTRA *Aeromonas hydrophila* A PART...

 TURNITIN PARA DOCTORADO (APROB, SUSTENTACIÓN Y REPOSITORIO)

 DOCTORADOS

 Universidad Peruana Cayetano Heredia

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::1:3234956569

Fecha de entrega

30 abr 2025, 3:03 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

30 abr 2025, 3:07 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

DENIS_HELAN_CASTILLO_PAREJA_-_TESIS_DOCTORAL.docx

Tamaño de archivo

11.3 MB

148 Páginas

26.755 Palabras

154.276 Caracteres



Página 1 of 155 - Portada

Identificador de la entrega trn:oid::1:3234956569



Página 2 of 155 - Integrity Overview

Identificador de la entrega trn:oid::1:3234956569

9% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Marco teórico	4
1.2.1. La mosca soldado negra: <i>Hermetia illucens</i> (Orden: Díptera).	4
1.2.1.1. Generalidades	4
1.2.1.2. Ciclo de vida de <i>Hermetia illucens</i> o mosca soldado negra	5
1.2.1.3. Importancia	6
1.2.1.4. Microbiota de los insectos	7
1.2.1.5. Los microorganismos como posibles fuentes de antibióticos.	9
1.2.2. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	10
1.2.2.1. Generalidades	10
1.2.2.2. Ecología	11
1.2.2.3. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> como patógeno oportunista	12
1.2.2.4. Potencial como productor de antibióticos	12
1.2.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
1.2.3.1. Generalidades	13

1.2.3.2. Ecología	14
1.2.3.3. Sensibilidad a antibióticos	15
1.2.4. Sistema inmune en peces	16
1.2.4.1. Generalidades	16
1.2.4.2. Respuesta inmune innata de peces frente a <i>Aeromonas</i>	17
1.2.4.2.1. Células fagocíticas	17
1.2.4.2.1. Proteínas antimicrobianas	17
1.2.4.2.1. Moléculas de reconocimiento de patrones	17
1.2.4.3. Respuesta inmune adaptativa de peces frente a <i>Aeromonas</i>	18
1.2.4.3.1. Linfocitos	18
1.2.4.3.1. Anticuerpos	18
1.2.4.3.1. Memoria inmunológica	19
1.2.4.4. Respuesta inmune inducida por productos naturales	19
1.3. Planteamiento del problema	22
1.4. Justificación del estudio	24
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo general	27
3.2. Objetivos específicos	27
IV. METODOLOGIA	28
4.1. Población, muestra u objeto de estudio	28
4.1.1. Diseño de estudio	28
4.1.2. Población	28

4.1.3. Muestras biológicas	28
4.1.3.1. Hongos	28
4.1.3.2. Bacteria patógena	29
4.1.3.3. Línea celular de mamífero	29
4.2. Procedimientos y técnicas	30
4.2.1. Pruebas de enfrentamiento entre hongos previamente aislados de larvas de la mosca <i>Hermetia illucens</i> y la bacteria patógena <i>Aeromonas hydrophila</i>	30
4.2.1.1. Pruebas de enfrentamiento utilizando el método cocultivo para hongos levaduriformes	30
4.2.1.2. Pruebas de enfrentamiento utilizando el método cocultivo para hongos filamentosos	32
4.2.2. Cultivo en masa de hongos con mayor actividad antagónica, preparación de extractos crudos y evaluación de su actividad antimicrobiana contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
4.2.2.1. Cultivos en masa de hongos filamentosos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> y <i>Chrysosporium</i> <i>multifidum</i>	34
4.2.2.2. Preparación de los extractos crudos AE, DCM y MeOH a partir de los hongos filamentosos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> y <i>Chrysosporium multifidum</i>	34

4.2.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos AE, DCM y MeOH y de sus fracciones sobre la bacteria <i>A. hydrophila</i> por la técnica de microdilución en caldo.	35
4.2.3. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo de diclorometano del hongo filamentoso <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> cepa HGU11_4	37
4.2.3.1. Fraccionamiento del extracto crudo DCM	38
4.2.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones	39
4.2.3.3. Sub-Fraccionamiento de las fracciones activas	39
4.2.3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones y/o subfracciones por bioautografía	40
4.2.4. Evaluación de la citotoxicidad y cálculo del Índice de Selectividad de fracciones activas frente a la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	42
4.2.4.1. Cultivo de la línea celular Raw Cells 2644.7	43
4.2.4.2. Evaluación de la citotoxicidad	44
4.2.4.3. Cálculo del Índice de Selectividad (IS)	45
4.2.5. Determinación de las moléculas activas mediante Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masas de alta resolución (HRMS)	45
4.3. Consideraciones éticas	46
4.4. Plan de análisis	46

V. RESULTADOS	49
5.1. Evaluación de la actividad antagónica de hongos levaduriformes y filamentosos contra la bacteria patógena <i>Aeromonas hydrophila</i>	49
5.1.1. Cultivos de hongos levaduriformes previamente aislados del tracto digestivo de <i>Hermetia illucens</i>	49
5.1.2. Pruebas de enfrentamiento entre los hongos levaduriformes y la bacteria patógena <i>Aeromonas hydrophila</i>	49
5.1.3. Cultivos de hongos filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de <i>Hermetia illucens</i>	51
5.1.4. Pruebas de enfrentamiento entre los hongos filamentosos y la bacteria patógena <i>Aeromonas hydrophila</i>	52
5.2. Preparación de 3 cultivos de hongos con mayor actividad antagónica, obtención de extractos crudos y evaluación de su actividad antimicrobiana contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	54
5.2.1. Obtención de los extractos crudos de AE, DCM y MeOH a partir de los hongos filamentosos <i>Aspergillus</i> sp., <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> y <i>Chrysosporium multifidum</i> con mayor actividad antagónica contra <i>Aeromonas hydrophila</i> .	54

5.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos AE, DCM y MeOH por la técnica de microdilución en caldo	55
5.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto DCM del hongo <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> por la técnica de bioautografía	57
5.3. Obtención de fracciones y subfracciones a partir del extracto crudo diclorometano del hongo filamentoso <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> cepa HGU11_4 y la evaluación de la actividad contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	58
5.3.1. Subfraccionamiento de la fracción M y evaluación de la actividad contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	60
5.3.2. Subfraccionamiento de la fracción E activo contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	62
5.4. Obtención de fracciones y subfracciones a partir de un segundo lote de extracto crudo diclorometano producido a partir del hongo filamentoso <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> cepa HGU11_4 activo contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	64
5.4.1. Subfraccionamiento de la fracción 4 y evaluación de la actividad contra la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	65
5.5. Análisis de la citotoxicidad de fracciones y subfracciones activas contra <i>Aeromonas hydrophila</i> frente a la línea celular de macrófagos de ratón Raw Cells 264.7 y cálculo del Índice de Selectividad (IS)	67

5.5. Análisis de compuestos	70
V. DISCUSIÓN	78
VI. CONCLUSIONES	95
VII. RECOMENDACIONES	96
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
IX. ANEXOS	

RESUMEN

Hermetia illucens es una mosca tropical cuyas larvas albergan una microbiota digestiva con propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas para humanos y animales de granja presentes en los desechos orgánicos. Ante estos hallazgos, nos planteamos como objetivo del estudio aislar e identificar preliminarmente nuevos compuestos activos contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* a partir de hongos previamente aislados del tracto digestivo de *H. illucens*. Se seleccionaron nueve especies de hongos (*Pichia kudriavzevii*, *Candida glabrata*, *Stephanoascus ciferrii*, Trichosporonales no clasificados, *Candida pseudorugosa*, *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Chrysosporium multifidum* y *Penicillium janthinellum*) para evaluar su capacidad inhibitoria contra *A. hydrophila* mediante el método de cocultivo. A partir del hongo *S. brevicaulis* que mostró un halo de inhibición de 6.4mm, se preparó un extracto Diclorometano (DCM) el cual presentó una IC₅₀ de 0.3mg/mL y una MIC de 0.5mg/mL utilizando la técnica de microdilución en caldo. El fraccionamiento biodirigido del extracto DCM permitió concentrar la actividad selectiva sobre *A. hydrophila* en las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 con valores de MIC de 125, 250 y 62.5µg/ml respectivamente. El análisis preliminar mediante UPLC-HRMS de las tres subfracciones activas permitió detectar catorce compuestos por comparación con bases de datos, incluyendo dipéptidos, lipopéptidos y derivados del ácido cólico, así como, lipopéptidos no descritos previamente.

PALABRAS CLAVES

Hermetia illucens, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aeromonas hydrophila*,
COCULTIVO, FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO, LIPOPÉPTIDOS.

ABSTRACT

Hermetia illucens is a tropical fly whose larvae host a digestive microbiota with antimicrobial properties against pathogenic bacteria for humans and farm animals present in organic waste. In view of these findings, the aim of the study was to isolate and preliminarily identify new compounds active against the pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila* from fungi previously isolated from the digestive tract of *H. illucens*. Nine fungal species (*Pichia kudriavzevii*, *Candida glabrata*, *Stephanoascus ciferrii*, unclassified Trichosporonales, *Candida pseudorugosa*, *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Chrysosporium multifidum* and *Penicillium janthinellum*) were selected to evaluate their inhibitory capacity against *A. hydrophila* by the coculture method. From the fungus *S. brevicaulis* with showed an inhibition halo of 6.4mm, a dichloromethane (DCM) extract was prepared which presented an IC₅₀ of 0.3mg/mL and a MIC of 0.5mg/mL using the broth microdilution technique. Bioguided fractionation of the DCM extract allowed concentrating the selective activity against *A. hydrophila* in subfractions 4.5, 4.6 and 4.7 with MIC values of 125, 250 and 62.5µg/mL respectively. Preliminary analysis by UPLC-HRMS of the three active subfractions allowed the detection of fourteen compounds by databases comparison, including dipeptides, lipopeptides and cholic acid derivatives, as well as previously undescribed lipopeptides.

KEYWORDS

Hermetia illucens, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aeromonas hydrophila*,
COCULTURE, BIODIRECTED FRACTIONATION, LIPOPEPTIDES.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

Las enfermedades bacterianas en peces son una de las principales amenazas para la industria piscicultura, con consecuencias económicas significativas. Entre las bacterias patógenas más comunes que afectan a los peces se encuentran *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas aeruginosa* (Setiaji et al., 2020; Gao et al., 2017; Perretta et al. 2019). Específicamente, *A. hydrophila* es considerada como la causa principal de la septicemia en peces de agua dulce ocasionando daños en órganos vitales como el bazo, las branquias y el estómago (Setiaji et al., 2020). Esta bacteria patógena afecta a diversas especies incluyendo el bagre (Jubirt et al., 2015), la tilapia (Oliveira et al., 2013), los salmónidos (Han et al., 2013), el paiche (Serrano-Martínez et al., 2014), entre otros.

En un esfuerzo por controlar estas enfermedades, se ha recurrido a menudo al uso de antibióticos en los estanques de cultivo de peces. Sin embargo, el abuso y mal uso de antibióticos en la acuicultura ha generado consecuencias adversas, incluida la creciente resistencia bacteriana en peces y la acumulación de residuos de antibióticos en el medio ambiente acuático (Yao et al., 2016; Setiaji et al., 2020). Estudios previos han documentado niveles elevados de resistencia a los antibióticos, por ejemplo, en el estudio de Samuel et al. (2011) se encontró que la bacteria *Escherichia coli* aislada de órganos digestivos del pez bagre presentaba niveles elevados de resistencia a ampicilina y cloranfenicol (Samuel et al., 2011). Por lo tanto, existe la necesidad de explorar en la biodiversidad la presencia de compuestos naturales con potencial actividad antibacteriana.

Una alternativa viable para combatir las enfermedades bacterianas radica en la utilización de hongos, los cuales cohabitan con otros microorganismos en el tejido intestinal de diferentes especies, como la mosca *Hermetia illucens* comúnmente conocida como mosca soldado negra. Trabajos previos han demostrado que las larvas adultas de *Hermetia illucens* desempeñan un papel esencial en la digestión de desechos orgánicos, y al mismo tiempo, poseen mecanismos que previenen el crecimiento de bacterias patógenas que están presentes en los desechos. De esa manera se previene la colonización de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* y *Helicobacter pylori* al producir componentes bacteriostáticos, bactericidas y fungicidas (Vogel et al., 2018, Erickson et al., 2004, Jeon et al., 2011, Lalander et al., 2013, Harlystiarini et al., 2019, Choi et al., 2012, Choi et al., 2018, Álvarez et al., 2019).

Además, en el trabajo de Jeon et al (2011) han postulado la posibilidad de que la microbiota de la mosca BSF (por sus siglas en inglés, Black Soldier Fly) esté implicada en la degradación de los desechos y produzca compuestos beneficiosos con propiedades antibacterianas o antifúngicas, actuando como un posible probiótico (Jeon et al., 2011). Además, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se observó el potencial rol probiótico que cumple la microbiota de las larvas de BSF mediante el aislamiento de microorganismos antagonistas de la bacteria *Staphylococcus aureus* MRSA, de los cuales un hongo, *Chrysosporium multifidum*, produjo compuestos antibacterianos que logramos caracterizar (Correa et al., 2019).

Estos hallazgos brindan evidencias y una nueva perspectiva con respecto a los potenciales efectos antimicrobianos de los microorganismos previamente aislados de las larvas de *H. illucens* sobre bacterias Gram negativas como *Aeromonas hydrophila*.

Dada la creciente amenaza que representa *A. hydrophila* en la producción acuícola, particularmente, con la aparición de cepas resistentes al tratamiento convencional con antimicrobianos, realizamos en este trabajo de investigación la caracterización preliminar de nuevas moléculas antimicrobianas derivadas de hongos previamente aislados de la microbiota de la mosca *Hermetia illucens* con el potencial de combatir eficazmente a la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*.

I.2. Marco teórico

I.2.1 La mosca soldado negra: *Hermetia illucens* (Orden: Díptera).

I. 2.1.1. Generalidades

La mosca *Hermetia illucens* ((Linnaeus, 1758; Orden Díptera; Familia Stratiomyidae), es conocida también como mosca soldado negra (Black Soldier Fly - BSF). Esta mosca es probablemente originaria de América y esta expandida principalmente en zonas tropicales de todo el mundo. Esta especie es considerada inocua para el ser humano debido a que no transmite enfermedades y prefiere habitar zonas alejadas de la presencia del hombre (Liu et al., 2019) (Figura 1a y 1b).

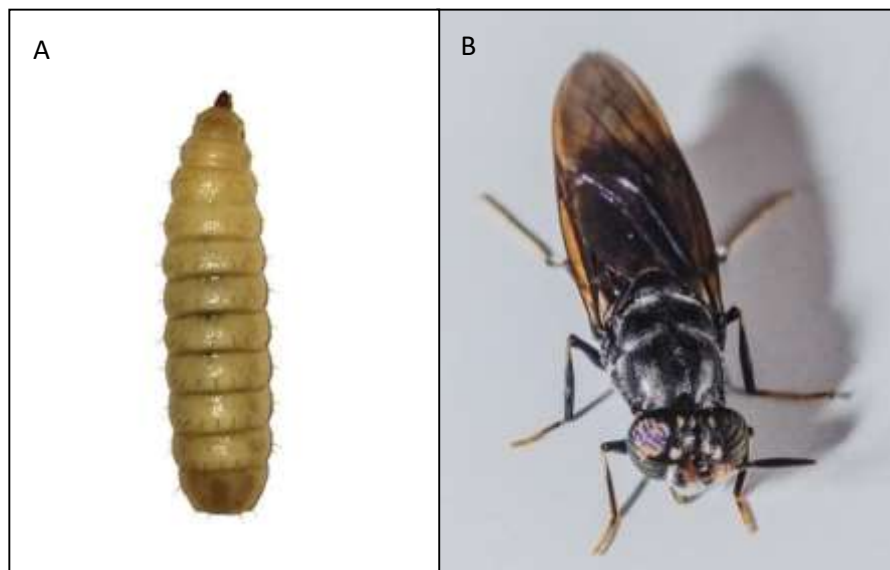


Figura 1: Ejemplares de *Hermetia illucens*. Estadío larval (A) y estadío adulto (B).

I.2.1.2 Ciclo de vida de *Hermetia illucens* o mosca soldado negra

El ciclo de vida de la mosca soldado negra está conformado por 4 estadíos: huevos, larvas, pupas y adultos. Su ciclo tiene un periodo de aproximadamente un mes y medio en condiciones de laboratorio con los parámetros de luz, temperatura y humedad controlados (Figura 2). La mosca hembra adulta, luego de aparearse, coloca sus huevos fertilizados formando una agrupación o clúster a partir del cual emergen microlarvas que tienen un tamaño aproximadamente de 0.5mm de largo (Correa 2018).

El crecimiento de las larvas se desarrolla en 6 subestadios (L1-L6). Estas larvas son ampliamente utilizadas para la bioconversión de desechos orgánicos (Figura 1A). Posteriormente, cuando la larva ha alcanzado el subestadio L6 (pre-pupa) migra a un ambiente oscuro, para protegerse de sus posibles predadores y así permitir la formación del estadio pupa que luego de un proceso de metamorfosis se convierte en una mosca adulta (Correa 2018).



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

I.2.1.3 Importancia.

De los cuatro estadios de la mosca soldado negra, el estadio de la larva es la más importante desde el punto de vista biotecnológico pues la larva tiene la capacidad de procesar una amplia variedad de desechos orgánicos (residuos de procesamiento de cultivos, de la agroindustria, desechos de alimentos, supermercados, estiércol y heces) lo que lleva a una bioconversión eficiente de desechos de poco valor agregado para generar una biomasa valiosa: 1g de huevos de larvas produce hasta 5kg de larvas adultas en menos de 14 días (Wang & Shelomi 2017). De esta manera, las larvas poseen valores ecológico, económico y científico puesto que son utilizadas en la bioconversión de desechos orgánicos, generan una disminución de la contaminación y al mismo tiempo el aumento de la masa larval, que es utilizada

actualmente como fuente nutritiva rica en lípidos ($28 \pm 8.6\%$) y proteínas ($40 \pm 3.8\%$) para animales de granja y peces (Wang & Shelomi 2017).

En un estudio realizado por Wang & Shelomi (2017) relativo al uso de las larvas se obtuvo una tasa de reciclaje de residuos altos y una alta productividad de la biomasa larval tomando en cuenta la composición del sustrato de alimentación, la tasa de consumo de alimento y parámetros ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo).

Otro aspecto importante del estadio larval de los insectos detritívoros es su microbiota intestinal que está conformada por bacterias y hongos y cumplen un rol importante en la degradación de la materia orgánica y sirven como un sistema inmune que previene la colonización de cepas patógenas (Roh et al., 2008).

I.2.1.4 Microbiota de los insectos.

Las asociaciones entre animales y microorganismos han sido estudiadas en los últimos años, con el fin de poder conocer la diversidad microbiana existente en el tracto digestivo de los hospedadores (Suh et al., 2003). Los microorganismos cumplen diversas funciones en las vías metabólicas de los invertebrados, entre ellas: la síntesis de lípidos, aminoácidos, esteroides, vitaminas, y feromonas, la degradación de sustratos y la desintoxicación de los compuestos inhibidores (Suh et al. 2005).

Los microorganismos endosimbióticos degradan ciertos sustratos que los hospedadores no lo pueden hacer por sí mismos, mostrando un rol primordial en la digestión enzimática de la materia orgánica. Además, esta microbiota sirve como

sistema inmune para los invertebrados, cumpliendo un papel importante en la prevención de la colonización de cepas patógenas (Amat-García et al., 2004).

La diversidad microbiana encontrada en el intestino del insecto, dependerá de la dieta y el estadio larval del insecto. Las comunidades microbianas serán predominantes y estables de acuerdo con la dieta que está degradando, y podría cambiar si esta dieta varía (Hayashi et al., 2007). Algo muy resaltante es que la microbiota intestinal puede ser usado como objeto de estudio, aplicando diversas técnicas de bioprospección para encontrar nuevas especies de bacterias y hongos. Las relaciones directas de hongos con insectos han sido poco estudiadas, pero se sabe que los hongos que habitan en el intestino son esenciales en la digestión enzimática de los sustratos (Vega y Blackwell M., 2005).

Además, diversos trabajos han demostrado que insectos de diferentes especies tienen la capacidad de generar sustancias antimicrobianas tanto en su superficie como es su tracto digestivo previniendo la infección microbiana (Erickson et al., 2004). La especie *Hermetia illucens*, que es utilizada para la bioconversión de desechos orgánicos, también genera compuestos antibacterianos para eliminar a microorganismos patógenos presentes en estos ambientes (Jeon et al., 2011; Liu et al., 2019).

La microbiota intestinal (comunidades bacterianas y fúngicas) de la larva de la mosca *Hermetia illucens* es diversa y abundante, y varía significativamente con el sustrato. Los taxones bacterianos predominantes son *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria*, mientras que entre los hongos podemos citar a *Pichia*, *Geotrichum* y *Trichosporon* (De Smet et al., 2018; Correa et al., 2019).

Se ha demostrado que una mayor presencia de los taxones bacterianos como *Firmicutes* que fermentan los carbohidratos complejos para producir butirato, o convierten el lactato en butirato y propionato y *Bacterioides* que tienen la capacidad de degradar un amplio repertorio de carbohidratos (por ejemplo, celulosa, pectina, galactomanano, arabinogalactano, alginato y xilanos), aportan una comunidad de bacterias beneficiosas para la larva de la mosca BSF y los animales que las consuman (Huyben et al., 2019, Okazaki et al., 2019).

I.2.1.5 Los microorganismos como posibles fuentes de antibióticos.

En la naturaleza, los microorganismos viven en constante competencia por los sustratos, por lo que han desarrollado mecanismos para protegerlos y defender su hábitat contra los potenciales competidores. Esta interacción, que sucede de manera natural, puede representarse en el laboratorio mediante la aplicación de un método de cocultivo *in vitro*. El método del cocultivo es una herramienta que permite incrementar la producción de una diversidad química de metabolitos secundarios por hongos o bacterias cuando se cultivan dos o más cepas diferentes en un mismo sistema (Marmann et al., 2014; Wakefield et al., 2017).

En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación del Laboratorio Andino Amazónico de Química de la Vida (LAVI - UPCH - IRD) se reportó la presencia de péptidos antimicrobianos de 4.2kDa aislados de larvas de la mosca *H. illucens* capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *Helicobacter pylori* (Álvarez et al., 2019). Además, en otro trabajo reciente de nuestro grupo de investigación LAVI - UPCH - IRD se aisló el hongo *Chrysosporium multifidum* a partir del contenido intestinal de las larvas de *H. illucens*. El aislamiento bioguiado del extracto del hongo permitió el aislamiento e identificación de un compuesto con

actividad moderada sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) con un MIC de 62.5µg/mL (Correa et al., 2019).

Además, en otro trabajo reciente se alimentaron larvas con diferentes tipos de sustratos. Los resultados mostraron poca similitud en la diversidad microbiana del contenido intestinal de la larva de BSF y la diversidad microbiana del sustrato con el cual son alimentadas. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas a nivel de la microbiota del contenido intestinal de las larvas alimentadas con diferentes sustratos, se observó que todas las larvas compartían 48 unidades taxonómicas operacionales (OTU) a nivel de especies bacterianas, siendo los *Firmicutes* y *Proteobacterias* la mayoría. La presencia de un corpus taxonómico constante de microbios puede deberse a la presencia de factores bióticos y abióticos generados por la larva que permite el establecimiento de esta microbiota específica en la larva de BSF (Wynants et al; 2019).

I.2.2. *Scopulariopsis brevicaulis*

I.2.2.1. Generalidades

Los hongos presentan una diversidad y capacidad para adaptarse a diferentes entornos convirtiéndolos en protagonistas cruciales en una variedad de procesos biológicos y ecológicos. Uno de los hongos que ha atraído la atención de los científicos en los últimos años es *Scopulariopsis brevicaulis*, un organismo que desempeña un papel significativo tanto en la parasitología humana como en la ecología de su hábitat. Además, este hongo muestra un prometedor potencial en la producción de antibióticos, siendo un candidato interesante en la búsqueda de soluciones para desafíos médicos actuales (Cuenca-Estrella et al., 2003).

I.2.2.2. Ecología

Scopulariopsis brevicaulis es un hongo filamentoso que pertenece al género *Scopulariopsis*, el cual se encuentra en la familia Microascaceae. Este organismo se caracteriza por su apariencia filamentosa y su capacidad de formar conidios, estructuras reproductivas asexuales, que le permiten propagarse ampliamente en su entorno. Aunque se ha descubierto en diversas localizaciones, *S. brevicaulis* es comúnmente encontrado en ambientes degradados, como suelos contaminados con productos químicos y materiales orgánicos en descomposición. Su presencia en ambientes degradados sugiere que este hongo podría tener un potencial significativo en la biorremediación, la cual implica el uso de organismos para eliminar contaminantes del suelo y el agua (Andrewes et al., 1998).

Además, *S. brevicaulis* puede formar simbiosis mutualistas con ciertas plantas, contribuyendo a la absorción de nutrientes y al crecimiento de estas. Esta interacción entre el hongo y las plantas resalta su relevancia en los sistemas ecológicos y subraya la necesidad de investigar más a fondo su papel en la dinámica de los ecosistemas terrestres (Andrewes et al., 1998).

Adicionalmente, este hongo ha demostrado una notable resistencia a condiciones adversas, incluyendo altas concentraciones de sal, variaciones de temperatura y niveles de humedad, lo que le permite sobrevivir en una amplia gama de hábitats (Mudau et al., 2016; Jay et al., 2003).

I.2.2.3. *Scopulariopsis brevicaulis* como patógeno oportunista

Uno de los aspectos más intrigantes de *S. brevicaulis* es su capacidad para actuar como un patógeno oportunista en seres humanos. Aunque no es un agente patógeno primario, este hongo ha sido asociado con infecciones en individuos inmunocomprometidos, como aquellos con sistemas inmunológicos debilitados debido a condiciones médicas subyacentes o tratamientos inmunosupresores. Las infecciones causadas por *S. brevicaulis* a menudo se presentan como micosis cutáneas o ungueales, y su diagnóstico y tratamiento pueden ser desafiantes debido a su similitud con otras infecciones fúngicas como la onicomycosis o dermatofitosis (Yao et al., 2015).

El hongo coloniza las uñas y la piel, y se ha aislado en muestras de tejido humano, particularmente en individuos con afecciones preexistentes como diabetes o enfermedades crónicas de la piel. A pesar de no ser tan conocido como otros patógenos fúngicos, la capacidad de *S. brevicaulis* para causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos subraya la importancia de comprender su biología y su potencial para la resistencia a los tratamientos antifúngicos convencionales (Sandoval-Denis et al., 2013).

I.2.2.4. Potencial como productor de antibióticos

La resistencia antimicrobiana es una creciente amenaza global para la salud humana, y la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos es crucial para abordar este desafío. En este contexto, *S. brevicaulis* ha surgido como un candidato prometedor en la producción de antibióticos. Este hongo tiene la capacidad de sintetizar una variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han

demostrado tener propiedades antimicrobianas (Elkhateeb y Daba, 2022).

Uno de los compuestos más estudiados de *S. brevicaulis* es la Escopularida A, que ha mostrado actividad antibacteriana contra patógenos resistentes a los antibióticos comunes como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y otras cepas de *Staphylococcus* y células tumorales. Además, se ha investigado su potencial para inhibir el crecimiento de otros hongos patógenos como *Candida albicans*, un hongo oportunista que puede causar infecciones en humanos, lo que sugiere su versatilidad como fuente de nuevos agentes antimicrobianos (Tamminen et al., 2014; Yu et al., 2008).

I.2.3. *Aeromonas hydrophila*.

I.2.3.1. Generalidades

Aeromonas es un género de bacterias Gram negativas, anaeróbicas facultativas, en forma de varilla, no formadoras de esporas. Este género se divide en *Aeromonas* psicofílicas no móviles y *Aeromonas* mesófilas móviles; estas bacterias se encuentran en depósitos de agua dulce, suelo, productos agrícolas y el tracto digestivo de peces, reptiles y vertebrados superiores. (Percival et al. 2014)

En este género se encuentra *Aeromonas hydrophila*, una bacteria perteneciente a la Familia Aeromonadaceae, Orden Aeromonadales y Clase Gammaproteobacteria. Se presentan en forma de bacilos móviles Gram negativos, oxidasa y catalasa positivo con un tamaño entre 1 y 3.5µm de diámetro.

I.2.3.2. Ecología

Aeromonas hydrophila está distribuida ampliamente en diversos ambientes acuáticos como ríos, lagos y estuarios, actuando como un patógeno oportunista de peces, anfibios, reptiles y mamíferos pudiendo incluso estar presente en el hombre (Janda y Abbott 2010, Zhou et al., 2019).

Se ha observado la presencia de bacterias del género *Aeromonas* en alimentos para el hombre como las carnes (ternero, ovino, cerdo, pescado y pollo), verduras, huevos, mariscos y derivados lácteos (Hoel et al., 2019; Hussain et al., 2014). Se considera que la fuente de contaminación es el agua dado que se ha reportado la presencia de *Aeromonas* en plantas de tratamiento de agua potable periféricas a centros urbanos (Robertson et al., 2014). Esta contaminación genera problemas de salud pública como meningitis, neumonía, sepsis asociada a heridas y diarreas en personas (Subbaram et al., 2019).

Además, *A. hydrophila* se ha relacionado con una fuerte mortalidad de peces en el mundo entero durante la última década. Esta bacteria causa forúnculos o úlceras en la piel de los peces y hasta hemorragias y septicemias, causando una mortalidad importante en las granjas de cultivos de especies como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón (*Salmo salar*), generando elevadas pérdidas económicas (Romstad et al., 2014; Gonçalves Pessoa et al., 2019).

Los factores de virulencia determinantes que están asociadas a *Aeromonas hydrophila* son citotóxicas, de adherencia y actividad hemolítica. También recientemente se han encontrado factores como proteasas, proteínas de membrana externa y proteína histone-like HU-2 (Frías et al. 2017).

I.2.3.3. Sensibilidad a antibióticos

Se ha reportado que *Aeromonas hydrophila* es resistente a quinolonas y betalactámicos y presenta una sensibilidad variable a otros antibióticos como ácido nalidíxico, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina y minocilina (Skwor et al., 2014; Zhou et al., 2019).

El uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura ha desencadenado la aparición de cepas de *A. hydrophila* resistentes a los tratamientos convencionales (Zhao et al., 2019). El principal mecanismo de resistencia de la bacteria *A. hydrophila* es la presencia de β -lactamasas cromosómicas inducibles (Stratev y Odeyemi 2016). Ante ello, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) recomienda, como pautas para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos frente a *A. hydrophila*, el uso del caldo Mueller-Hinton ajustado a cationes para las pruebas de la determinación de la MIC por microdilución, mientras que el agar Mueller-Hinton se recomienda utilizarlo para la determinación de la MIC por difusión en disco (Jorgensen y Hindler 2007).

Teniendo en cuenta la necesidad de contrarrestar o prevenir la infección por *A. hydrophila* en la crianza de peces en sistemas acuícolas, se hace necesario buscar nuevos compuestos activos contra esta bacteria patógena.

I.2.4. Sistema inmune en peces.

I.2.4.1. Generalidades

Los peces, desde las pequeñas especies de agua dulce hasta los impresionantes depredadores marinos, prosperan en una variedad de entornos acuáticos como ríos, lagos y océanos profundos. Los peces, durante su ciclo de vida, están expuestos a una variedad de amenazas como patógenos microbianos, depredadores y cambios ambientales, lo que hace que su sistema inmunológico sea un componente esencial para su supervivencia y bienestar.

La interacción entre los peces y microorganismos patógenos representa un desafío constante para su salud y bienestar del vertebrado. Uno de los patógenos más preocupantes en este contexto es *Aeromonas hydrophila*, una bacteria que puede causar enfermedades graves en una amplia variedad de especies de peces en hábitats acuáticos de todo el mundo descritas en la sección anterior.

La evolución ha dotado a los peces con un sistema inmunológico adaptado para detectar, combatir y neutralizar amenazas microbianas como *Aeromonas hydrophila*. La respuesta inmunológica frente a esta bacteria es un proceso multifacético que involucra tanto componentes innatos como adaptativos. Las respuestas inmunitarias innatas incluyen la activación de células fagocíticas, la producción de proteínas antimicrobianas y la participación de moléculas de reconocimiento de patrones que alertan al sistema inmunológico sobre la presencia de microorganismos patógenos. Mientras que, las respuestas inmunitarias adaptativas incluyen la activación de linfocitos B, producción de anticuerpos y generación de una memoria inmunológica.

1.2.4.2. Respuesta inmune innata de peces frente a *Aeromonas*

Las respuestas inmunitarias innatas desarrolladas por los peces frente a una infección por *Aeromonas* son:

1.2.4.2.1. Células fagocíticas: Las células fagocíticas son componentes clave del sistema inmunológico innato en peces. Estas células, que incluyen a los macrófagos y los neutrófilos, tienen la capacidad de detectar, rodear y absorber a los microorganismos invasores, como *Aeromonas hydrophila*. Una vez que las células fagocíticas capturan a las bacterias, las destruyen en su interior mediante la liberación de enzimas como la lisozima la cual tiene mayor actividad bactericida que la lisozima de vertebrados superiores y sustancias tóxicas como óxido nítrico y anión superóxido (Ellis A.E. 2001; Zhang et al., 2014; John et al., 2002).

1.2.4.2.2. Proteínas antimicrobianas: El sistema inmunológico innato de los peces produce proteínas antimicrobianas como péptidos catiónicos y lectinas, que son efectivas contra una variedad de microorganismos patógenos, incluyendo *Aeromonas*. Estas proteínas tienen la capacidad de dañar las membranas celulares de los patógenos y, en algunos casos, interferir con su capacidad de reproducción (Ellis A.E. 2001).

1.2.4.2.3. Moléculas de reconocimiento de patrones: Estas moléculas son proteínas especializadas que pueden identificar estructuras específicas en las superficies de los microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) dentro de los cuales podemos citar al lipopolisacárido (LPS), péptidoglicano, flagelina y ADN bacteriano no metilado. Cuando se encuentran con PAMPs, estas moléculas alertan al sistema inmunológico sobre la presencia de *A. hydrophila* desencadenando

respuestas inflamatorias mediado por receptores de tipo Toll 5 (flagelina) o Toll 9 (ADN bacteriano), la activación de células fagocíticas para eliminar al patógeno y la liberación de moléculas señalizadoras que alertan al sistema inmunológico sobre la presencia de la bacteria patógena (Basu et al., 2015; Qin et al., 2019).

1.2.4.3. Respuesta inmune adaptativa de peces frente a *Aeromonas*

En casos en los cuales el patógeno sigue presente, aun después de la respuesta inmune innata, se activarán las respuestas inmunes adaptativas. Las respuestas inmunes adaptativas desarrolladas por los peces frente a una infección por *Aeromonas* son:

1.2.4.3.1. Linfocitos: Los linfocitos son células especializadas del sistema inmunológico adaptativo de los peces. Los dos tipos principales de linfocitos son los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos T (CD4+ o CD8+) desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunológica adaptativa al reconocer y destruir células infectadas por patógenos. Los linfocitos B, por otro lado, producen anticuerpos que pueden unirse a las bacterias y otros patógenos para neutralizarlos (Smith et al., 2019).

1.2.4.3.2. Anticuerpos: Los anticuerpos son proteínas producidas por los linfocitos B que se unen de manera específica a los antígenos en la superficie de los patógenos, como las bacterias. los anticuerpos que se producen en respuesta a una infección por *Aeromonas* son principalmente inmunoglobulinas (Igs) de una variedad diferente en comparación con los mamíferos. Dentro de las Igs que se han identificado en peces incluyen la IgM (respuesta inmunológica inicial), IgT (producido en branquias e intestino) e IgG producido en algunas especies de peces (Mashoof y Criscitiello, 2016, Smith et al., 2019).

Este proceso de unión marca a los patógenos para su destrucción por parte de otras células del sistema inmunológico o para su eliminación del cuerpo ayudando a prevenir reinfecciones futuras al crear una memoria inmunológica.

1.2.4.3.3. Memoria Inmunológica: Uno de los aspectos más destacados del sistema inmunológico adaptativo en peces es la capacidad de desarrollar memoria inmunológica. Cuando un pez se expone a una bacteria como *Aeromonas hydrophila*, el sistema inmunológico "recuerda" la infección y puede responder de manera más eficiente y efectiva si se encuentra nuevamente con el mismo patógeno en el futuro. Esta memoria inmunológica puede ser fundamental para la supervivencia de los peces en ambientes donde los patógenos son persistentes (Smith et al., 2019).

1.2.4.4. Respuesta inmune inducida por productos naturales

Los productos naturales derivados de diversas fuentes, como plantas, hongos y otros organismos, han sido objeto de investigación para comprender su capacidad para inducir y modular la respuesta inmunológica en peces. Estos productos naturales a menudo contienen compuestos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras que podrían ser útiles para conservar las poblaciones de peces silvestres y de producción acuícola y así mejorar la resistencia de los peces a enfermedades producidas por *A. hydrophila*, reduciendo la necesidad de antibióticos.

En un trabajo realizado por Ran et al. (2016) se administró en la dieta de Tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) levaduras enteras al 2% o lisadas al 0.3% (pared celular) y luego fueron infectados con *A. hydrophila*. Los resultados mostraron un efecto protector de la dieta de levaduras enteras y lisadas en la infección mediante la estimulación del aumento de poblaciones de células del tipo neutrófilos,

macrófagos y linfocitos lo que evidencia una potenciación de una respuesta de tipo celular en el pez. Si bien es cierto que esta respuesta celular no es específica, los resultados sugieren la importancia de la dieta con este tipo de hongo para generar un efecto beneficioso sobre el sistema de defensa inmune en el pez.

En otro trabajo realizado por Iwashita et al. (2015) evaluaron los efectos del uso de bacterias *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* como suplementos dietéticos para juveniles de Tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) para mejorar la inmunidad innata y resistencia frente a *A. hydrophila*. Los resultados mostraron en peces alimentados con los microorganismos un aumento en el número de glóbulos blancos y una disminución de la mortalidad proponiendo el uso combinado de *B. subtilis*, *A. oryzae* y *S. cerevisiae* como probióticos beneficiosos para juveniles de *O. niloticus*.

Además del uso de hongos y bacterias como agentes inmunomoduladores en el pez, también se ha explorado el uso de extractos de plantas y/o compuestos como agentes que promueven la producción de respuestas protectoras en el pez. En un estudio realizado por Kumar et al. (2013), se investigó cómo la inclusión de Azadiractina, un compuesto obtenido de la planta medicinal *Azadirachta indica*, en la dieta de peces dorados (*Carassius auratus*) podría afectar su respuesta inmunológica ante la infección con la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Los resultados del estudio revelaron mejoras significativas en varios aspectos del sistema inmunológico de los peces que recibieron la suplementación con Azadiractina en comparación con un grupo de control. En particular, se observó un aumento en la cantidad de inmunoglobulina total, leucocitos, actividad fagocítica y actividad de lisozima sérica en los peces suplementados con Azadiractina. Estos

hallazgos sugieren que la molécula Azadiractina tiene el potencial de actuar como un agente inmunoestimulante en la industria acuícola.

Estos estudios destacan cómo los compuestos naturales, obtenidos de una diversidad de fuentes, pueden desencadenar mejoras significativas en la respuesta inmunológica de los peces, lo que podría tener importantes aplicaciones en la acuicultura para fortalecer la salud y la resistencia de los peces frente a enfermedades causadas por la bacteria patógena para peces *A. hydrophila*.

I.3. Planteamiento del problema

Actualmente en la industria agropecuaria y piscícola a nivel mundial se administran antibióticos como profilaxis para prevenir las infecciones o como promotores de crecimiento con el propósito de incrementar la productividad (van Duijkeren et al., 2019). Bajo esta “estrategia” los alimentos de los animales son suplementados con dosis infraterapéuticas de antibióticos con el fin de prevenir la aparición de brotes y aumentar la masa corporal (Lillehoj et al., 2018). Esta estrategia de producción, que se realiza intensamente en aves de corral, cerdos y peces está generando un grave problema de salud pública debido a que favorece la proliferación de cepas bacterianas patógenas resistentes que afectan la salud animal y de las personas que los consumen (Roth et al., 2019, Zeineldin et al., 2019). Este aumento de la resistencia bacteriana puede generarse por un contacto directo o indirecto, mediante la manipulación y/o consumo de alimentos, agua, polvo, residuos y, además, por la utilización de desechos animales como abono en campos de cultivo. Esta propagación puede aumentar significativamente mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia presentes en los plásmidos por medio de la conjugación bacteriana entre especies residentes de los animales de corral o peces y bacterias residentes del medio ambiente cercanas a las granjas.

El género *Aeromonas* constituye un grupo de bacterias patógenas de importancia para la acuicultura ya que pueden actuar causando úlceras en la piel y hasta hemorragias y septicemias en peces como el salmón del Atlántico en Chile (*Salmo salar*) (Valderrama et al., 2019), la trucha Arco Iris en Perú (*Oncorhynchus mykiss*) (Mateo et al., 2016) con porcentajes de pérdidas que pueden llegar al 51% (Zepeda., 2015) y el paiche (*Arapaima gigas*) (Reis Dias et al., 2019).

Además de ello se observó que *Aeromonas hydrophila* son resistentes a penicilinas y cefalosporinas. Esta resistencia puede deberse al mecanismo de transferencia horizontal de elementos móviles del genoma que poseen una amplia gama de genes de resistencia.

En un trabajo reciente se realizó un estudio de la resistencia a los antimicrobianos en diversas especies de *Aeromonas* aisladas de peces criados en estanques artificiales en Uruguay (Perretta et al., 2019). Los resultados mostraron el elevado número de aislamientos de cepas de *Aeromonas* multirresistentes en criaderos artificiales, siendo principalmente resistentes a macrólidos y penicilinas naturales. Este hecho es de gran relevancia, puesto que, además de generar dificultades para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Aeromonas*, también, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia que pueden dispersarse hacia otros ecosistemas en el medio acuático.

Recientemente un grupo de investigación realizó la evaluación de la actividad de glucoproteínas aisladas de levadura contra *Aeromonas caviae*. En este trabajo se observó que la glucoproteína G tuvo una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 83.3mg/mL y una concentración mínima bactericida (MBC) de 166.7mg/mL revelando importantes conocimientos sobre un posible control ecológico con productos naturales (Wu et al., 2020).

Ante este problema de resistencia antimicrobiana se propuso en este trabajo de investigación aislar e identificar preliminarmente nuevas moléculas antibióticas contra *Aeromonas hydrophila* a partir de la microbiota previamente aislada del tracto digestivo de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*).

I.4. Justificación del estudio

Las larvas adultas de la mosca soldado negra (BSF) o *Hermetia illucens* poseen un interés debido a que, además de jugar un rol importante en la digestión de desechos orgánicos, presentan diversos mecanismos para combatir la presencia de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella sonnei* mediante la producción de componentes bacteriostáticos, bactericidas y fungicidas (Vogel et al., 2018, Erickson et al., 2004, Jeon et al., 2011, Lalander et al., 2013, Harlystiarini et al., 2019, Choi et al., 2012, Choi et al., 2018).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha evaluado la actividad de péptidos antimicrobianos aislados de la hemolinfa de larvas de *Hermetia Illucens*. Se encontró que una mezcla de 4 péptidos con masa molecular similar, purificados y caracterizados mediante técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Espectrometría de masas acoplado a un UPLC (UPLC-MS), presentaron actividad contra la cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori*. (Álvarez et al., 2019).

Así mismo, nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente otro trabajo de investigación en el cual se logró evidenciar el potencial rol que cumple la microbiota de la mosca BSF el cual podría actuar como apoyo del sistema inmune. En este trabajo se aisló la molécula 5,6-dihidro-4-metoxi-6- (1-oxopentil) -2H-piran-2-ona a partir del hongo *Chrysosporium multifidum* aislado del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens*. Este compuesto aislado y caracterizado mediante técnicas químicas (UPLC-MS, RMN) y biológicas (MIC por microdilución en caldo, bioautografía y método de Kirby-Bauer) presentó una IC₅₀

de 11.4µg/mL y una MIC de 32.5µg/mL sobre la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* MRSA (Correa et al., 2019).

Estos hallazgos brindan evidencias y una nueva perspectiva con respecto a los efectos antimicrobianos de los microorganismos presentes en la microbiota de la larva de *H. illucens* sobre bacterias Gram negativas como *Aeromonas hydrophila*, que genera un impacto negativo en la producción acuícola y que se agrava aún más con la aparición de cepas resistentes al tratamiento convencional con antimicrobianos (Ren et al., 2019).

La aparición de resistencia a los antimicrobianos y la necesidad de un mejor agente antimicrobiano de amplio espectro siempre tiene una gran demanda en la industria agropecuaria y acuícola. Por lo tanto, es esencial explorar estrategias de prevención y control para aliviar de manera efectiva la resistencia a los antimicrobianos.

Ante estos hallazgos, en este trabajo de investigación se propuso realizar un screening de los microorganismos pertenecientes a la microbiota de la mosca BSF que inhiban el crecimiento de la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* con el fin de caracterizar preliminarmente los compuestos activos presentes utilizando técnicas químicas de aislamiento (UPLC-MS) acoplado a pruebas de validación biológicas (método de Kirby-Bauer, Bioautografía y MIC por microdilución en caldo).

II. HIPÓTESIS

La evaluación de la actividad antagónica de los hongos previamente aislados del tracto digestivo de las larvas de *Hermetia illucens* permitirá la identificación preliminar de moléculas presentes en una fracción activa contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila* lo que podría tener implicaciones significativas en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para la prevención y el tratamiento de las infecciones en peces causadas por esta bacteria.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Aislar e identificar preliminarmente moléculas producidas por la microbiota previamente aislada de la mosca *Hermetia illucens* presentes en una fracción activa contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila*

III.2. Objetivos específicos

- 1) Realizar pruebas de enfrentamiento entre microorganismos previamente aislados del tracto digestivo de las larvas de *Hermetia illucens* y la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.
- 2) Cultivar en masa el hongo u hongos con mayor actividad antagónica, preparar extractos crudos y evaluar su actividad antimicrobiana contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*.
- 3) Preparar fracciones activas contra *Aeromonas hydrophila* a partir del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*.
- 4) Identificar preliminarmente las moléculas presentes en una fracción activa contra *Aeromonas hydrophila* mediante técnicas de química estructural utilizando un espectrómetro de masa de alta resolución acoplado a un UPLC (UPLC-HRMS).

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Población, muestra u objeto de estudio

IV.1.1. Diseño de estudio

El presente trabajo de tesis doctoral se enmarca en un diseño de tipo experimental prospectivo en el cual se recopilaban datos de actividad antimicrobiana a medida que avanzó la marcha experimental de bioensayo. Para ello, se llevaron a cabo evaluaciones de los diámetros de inhibición, la concentración inhibitoria media (IC₅₀), la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de los extractos y fracciones obtenidos a partir del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* activo contra *A. hydrophila*.

IV.1.2. Población

La población de estudio estuvo compuesta por hongos levaduriformes y filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens* también conocida como mosca soldado negra (BSF). Además, se incluyó la bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 adquirida comercialmente y células de mamífero proveniente de una línea celular de macrófago de ratón Raw Cells 264.7.

IV.1.3. Muestras biológicas

IV.1.3.1. Hongos

Se utilizaron 5 especies de hongos levaduriformes *Pichia kudriavzevii* (cepas HGS11_1, HGS11_2, HGS11_5, HGS11_6, HGS11_7, HGS11_8, HGS11_12 y

HGS11_14), *Candida glabrata* (cepas HGS11_3, HGS11_4, HGS11_9 y HGS11_13), *Stephanoascus ciferrii* (cepa HGM11_6), Trichosporonales no clasificados (HGM11_9; HGM11_10; HGM11_11) y *Candida pseudorugosa* (cepa HGM11_13) y 4 especies de hongos filamentosos *Aspergillus* sp. (cepas HGU11_2, HGU11_3 y HGU11_11), *Scopulariopsis brevicaulis* (cepas HGU11_4 HGU11_5 HGU11_6 HGU11_7), *Chrysosporium multifidum* (cepa HGU11_8) y *Penicillium janthinellum* (cepa HGU11_10) previamente aislados a partir del tracto digestivo de larvas de la mosca soldado negra (BSF – *Hermetia illucens*). Estos hongos fueron mantenidos mediante repiques continuos en Agar Sabouraud y cultivados a 30°C.

IV.1.3.1. Bacteria patógena

Se utilizó la especie bacteriana *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 patógena de peces para la evaluación del MIC y el MBC. Esta bacteria fue mantenida mediante repiques continuos en agar Tripticasa de soya a 30°C.

IV.1.3.1. Línea celular de mamífero

Se utilizó la línea celular de macrófago de ratón Raw Cells 264.7 gentilmente donada por el Laboratorio de Patho-antígenos a cargo del Dr. Jorge Arévalo Zelada. Esta línea celular permitió obtener valores de citotoxicidad (IC₅₀) y obtener el Índice de Selectividad (IS) cuyos procedimientos experimentales se describen en el procedimiento IV.2.4.

IV.2. Procedimientos y técnicas

IV.2.1. Pruebas de enfrentamiento entre hongos previamente aislados de larvas de la mosca *Hermetia illucens* y la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*

Esta prueba se realizó con la finalidad de seleccionar aquellos hongos levaduriformes o filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de la larva de la mosca BSF que produjeron compuestos antimicrobianos contra *A. hydrophila* ATCC 7966. Luego se seleccionó el microorganismo con mayor actividad antimicrobiana y que fuera novedoso en relación con la producción de compuestos activos.

IV.2.1.1. Pruebas de enfrentamiento utilizando el método cocultivo para hongos levaduriformes

El enfrentamiento entre 17 cepas levaduriformes previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra y *Aeromonas hydrophila* se realizó mediante el método “Agar Slab” modificado o disco de agar. El efecto antagonista se detectó mediante la presencia de zonas de inhibición alrededor del disco de agar. Se utilizó el antibiótico Tetraciclina como control positivo contra la bacteria patógena.

El diseño experimental consistió en preparar una suspensión de *A. hydrophila* ATCC 7966 a la concentración de 1×10^6 UFC/mL en Agar Nutritivo, para posteriormente enfrentarlas con los hongos levaduriformes de BSF (Andrzejewska et al., 2007, Polak-Berecka et al., 2009, Pereira et al., 2013).

Los hongos levaduriformes previamente aislados del tracto digestivo de la larva de la mosca BSF fueron sembrados por incorporación a una concentración de 1×10^6 UFC/mL en una placa conteniendo 15 mL de agar Sabouraud he incubadas a la temperatura de 30°C por un tiempo de 24 horas. Posteriormente se cortaron segmentos circulares de 5mm de diámetro a partir del cultivo de cada microorganismo aislado de BSF y fueron colocados cuidadosamente sobre el agar nutritivo recientemente cultivado con la bacteria patógena *A. hydrophila*. El enfrentamiento se realizó por un tiempo de 24 horas a la temperatura de 30°C, luego de este tiempo se verificó la presencia de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Se evaluó la presencia de una zona de inhibición de crecimiento de la cepa bacteriana patógena para peces alrededor del bloque de cultivo circular conteniendo al microorganismo de BSF (Figura 3). Se midió el diámetro de inhibición y se calculó el Potencial Antimicrobiano (PA) de cada microorganismo de BSF ($PA = \text{diámetro del halo de inhibición} / \text{diámetro del crecimiento de microorganismo de BSF}$). Los microorganismos de BSF con actividad antimicrobiana presentaron valores de PA mayores a 1, mientras que los microorganismos de BSF sin actividad antimicrobiana presentaron valores iguales a 1. Se utilizaron discos de agar de 5mm de diámetro conteniendo 30µg de Tetraciclina como control positivo.

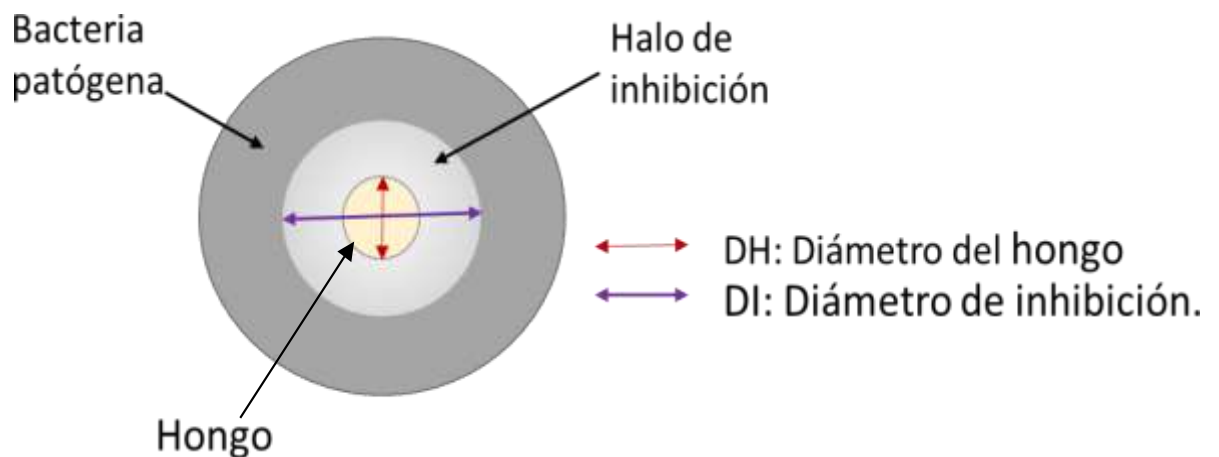


Figura 3: Representación gráfica de la actividad antagonista esperada en el enfrentamiento fúngico levaduriforme contra *Aeromonas hydrophila*. Las flechas morada y roja señalan los diámetros evaluados para obtener el potencial antimicrobiano. Fuente (Correa 2018)

IV.2.1.2. Pruebas de enfrentamiento utilizando el método del cocultivo para hongos filamentosos

Esta prueba se realizó con la finalidad de seleccionar aquellos hongos filamentosos que inhiban el crecimiento de la bacteria patógena *A. hydrophila*. Para ello, se utilizó el método de “Cocultivo” para observar *in vitro* la capacidad antagonista de los microorganismos aislados de larvas de la mosca BSF contra *A. hydrophila*. El efecto antagonista se detectó mediante la presencia de zonas de inhibición alrededor de la zona de crecimiento del hongo filamentosos. Se utilizó el antibiótico Tetraciclina como control positivo contra la bacteria patógena.

El diseño experimental consistió en preparar un cultivo de hongos filamentosos en agar papa dextrosa (APD) por 5 días a 30°C. Posteriormente se recolectaron las esporas y se cuantificaron en un microscopio óptico a 40X de aumento. Luego 10µL

de la suspensión de esporas conteniendo 10 esporas fueron sembradas en una placa de agar Sabouraud y puesto a cultivar por 6 días a 30°C. Luego del periodo de incubación, cuando el hongo filamentoso ha crecido, se inocularon, con un hisopo estéril, las bacterias de *A. hydrophila* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL en toda la placa sin entrar en contacto con el hongo filamentoso. El enfrentamiento se realizó por el tiempo de 24 horas a la temperatura de 30°C, luego de este tiempo se evaluó la presencia de zonas de inhibición. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado (Andrzejewska et al., 2007, Polak-Berecka et al., 2009, Pereira et al., 2013).

IV.2.2. Cultivo en masa de hongos con mayor actividad antagónica, preparación de extractos crudos y evaluación de su actividad antimicrobiana contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir del punto IV.2.1.1 y IV.2.1.1.2 se seleccionaron a los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* por su mayor actividad contra *Aeromonas hydrophila*. Estos hongos fueron cultivados en un volumen de 500mL para obtener extractos crudos extraídos por los solventes orgánicos Acetato de Etilo (AE), Diclorometano (DCM) y Metanol (MeOH). Posteriormente los extractos crudos fueron evaluados a nivel de su actividad *In vitro* contra *A. hydrophila* utilizando las técnicas de microdilución en caldo y bioautografía.

IV.2.2.1. Cultivos en masa de hongos filamentosos *Aspergillus sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum*

Se preparó 500mL de cultivo de las especies de hongos filamentosos *Aspergillus sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum*. Para ello se realizaron repiques de cada especie de hongo en Agar Sabouraud y luego fueron cultivados a 30°C por 5 días. Posteriormente se recolectaron las esporas de cada hongo y se contaron en microscopio óptico a fin de preparar una dilución que permita obtener una concentración inicial de 1×10^6 esporas/mL de caldo Mueller Hinton (MHB). Finalmente, el cultivo de cada hongo realizado en caldo MHB fue colocado en un Shaker orbital de la marca MRC a 100 revoluciones por minuto (RPM) y 30°C durante 5 días para su utilización en el siguiente procedimiento IV.2.2.2.

IV.2.2.2. Preparación de los extractos crudos AE, DCM y MeOH a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum*

A partir del cultivo de 500mL de los hongos filamentosos *Aspergillus sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* se procedió a obtener los extractos AE, DCM y MeOH. Para ello, el cultivo en caldo MHB de cada hongo fue filtrado utilizando papel Whatman N°2 que fue colocado sobre un embudo de Büchner y conectado a una bomba de vacío. El sobrenadante (SN) fue particionado en 2 volúmenes de 250mL para realizar la extracción volumen-volumen con AE (1:1) y DCM (1:1), mientras que el pellet fue mezclado con Metanol/agua (8:2) a una concentración del 10% peso/volumen y sonicado para la lisis celular y la posterior liberación de los componentes intracelulares. Posteriormente, cada una de

las fases AE, DCM y MeOH (preparados de manera independiente) fueron separadas de la fase acuosa en ampollas de decantación de 500mL. Finalmente, las fases AE, DCM y MeOH fueron evaporadas utilizando un rotaevaporador (BÜCHI B-480). Todos los extractos libres de solvente fueron pesados en una balanza analítica Ohaus Adventure™, disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 400mg/ml y almacenados a -20°C hasta su utilización en el siguiente procedimiento IV.2.2.3.

IV.2.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos AE, DCM, MeOH y de sus fracciones sobre la bacteria *A. hydrophila* por la técnica de microdilución en caldo.

Se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀), la Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el total crecimiento bacteriano (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida que elimina el 99.9% de los microorganismos viables (MBC) de los extractos obtenidos a partir de los hongos activos contra *A. hydrophila* utilizando la metodología de microdilución en caldo en placas de 96 pozos (Miller et al., 2005, Gieseke et al., 2012, Correa et al., 2019).

El diseño experimental consistió en utilizar cultivos de 24 horas de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 a una concentración de 1x10⁶ UFC/mL en un volumen final de 100µl/pozo de caldo de cultivo Luria Bertani (LB). Sobre este cultivo se colocaron los extractos disueltos en DMSO en un rango de concentración de 0.125 a 4mg/mL. El control positivo Tetraciclina se administró por triplicado en un rango de concentración de 0.004 a 2µg/mL. Posteriormente, los cultivos fueron incubados

por 24 horas a 37°C y se determinó el crecimiento bacteriano mediante la lectura de la Densidad óptica (OD) a 650nm utilizando el multilector de placas Chameleon V.

En este diseño experimental se consideraron los siguientes controles:

- Control de crecimiento: Pocillos conteniendo a la bacteria patógena *A. hydrophila* cultivada en caldo de cultivo LB.
- Control Positivo: Pocillos conteniendo a la bacteria patógena *A. hydrophila* cultivada en caldo de cultivo LB suplementado con el antibiótico Tetraciclina.
- Control Negativo: Pocillos conteniendo a la bacteria patógena *A. hydrophila* cultivada en caldo de cultivo LB suplementado con el diluyente DMSO en un rango de porcentajes que fueron del 0.01 al 1%.
- Control de extracto: Pocillos conteniendo caldo de cultivo LB suplementado con los extractos disueltos en DMSO.

Para la determinación de la IC₅₀ se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración del extracto. Los porcentajes de inhibición fueron obtenidos mediante 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 ausencia de los extractos y Am es la absorbancia de la bacteria patógena expuesta al extracto crudo activo. Por último, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) fue determinada utilizando la plantilla PROBIT en Excel para Windows 10.

Para la determinación de la MIC, se evaluó de manera visual la mínima concentración del extracto o fracción que inhibe el total crecimiento bacteriano.

Para la determinación de la MBC, se extrajo con una aza de siembra estéril una alícuota de los cultivos expuestos a los extractos o fracciones que presentaron una concentración que inhibió el total crecimiento bacteriano y se sembró en agar BHI libre de extracto o fracción inhibitoria de crecimiento. Posteriormente, las placas con agar BHI fueron incubadas a 30°C por 24 horas. Finalmente, se evaluó de manera visual la mínima concentración del extracto o fracción que elimina el 99.9% de los microorganismos viables.

Al final de este procedimiento se observó que la fracción DCM del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 presentó mayor actividad antimicrobiana a nivel de la IC₅₀, MIC y MBC en comparación con las otras fracciones de los hongos filamentosos *Aspergillus sp.* cepa HGU11_3 y *Chrysosporium multifidum* cepa HGU11_8.

IV.2.3. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo de diclorometano del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4

Luego de realizar el análisis biológico de los extractos crudos AE, DCM y MeOH descritos en el procedimiento IV.2.2, se decidió continuar con el fraccionamiento del extracto DCM por presentar actividad promisorio contra la bacteria *A. hydrophila*. Para ello, se realizó un cultivo en masa del hongo *S. brevicaulis* cepa HGU11_4 en 25L de caldo Mueller Hinton el cual fue incubado en un Shaker orbital a 100 RPM a 30°C durante 5 días a fin de obtener un peso de 1500mg del extracto crudo DCM para su posterior fraccionamiento biodirigido mediante la evaluación de la actividad por el método de bioautografía. Finalmente, aquellas fracciones

activas contra *A. hydrophila* serán subfraccionadas y evaluadas a nivel de su actividad antimicrobiana.

IV.2.3.1. Fraccionamiento del extracto crudo DCM

Siguiendo el esquema presentado en el Anexo 1, se procedió con el fraccionamiento de 1500mg del extracto crudo diclorometano del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 mediante la técnica de cromatografía líquida de mediana presión (MPLC) en una columna preparativa de sílica gel RP-18 (fase reversa, Merck) con una bomba BÜCHI C-605 acoplada a un controlador BÜCHI C-615. Para ello, se pesó 30g de sílica gel RP-18 y se colocó en la columna de vidrio para formar una fase compacta.

Seguidamente se eluyó preliminarmente la columna para extraer el aire con una solución de agua:acetonitrilo en proporción 9:1 con un flujo de 15mL/min. Luego, se colocó 1.5g del extracto crudo DCM de *S. brevicaulis* previamente absorbido en 5 gramos de sílica gel RP-18 y se estableció el flujo a 5 mL/min alimentando el sistema con el mismo eluyente agua:acetonitrilo a las proporciones 9:1, 8:2 y 7:3. De manera continua se fueron colectando las fracciones en tubos de vidrio de 13x100mm.

Posteriormente, cada fracción fue evaluada en placas de cromatografía de capa fina (TLC) de fase normal para luego unir las según su perfil cromatográfico. A continuación, una vez unidas las fracciones, se evaporó el solvente utilizando el rotaevaporador (BÜCHI - B480), se pesaron las fracciones y se almacenaron a 4°C hasta realizar los ensayos de actividad antimicrobiana contra *A. hydrophila*.

IV.2.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones

El extracto diclorometano y sus respectivas fracciones preparadas en el punto anterior fueron sembradas en placas de Sílica gel 60^oA y de fase reversa RP-18 con indicador de fluorescencia F-254 para analizar el perfil de compuestos. Para ello se colocó 5 μ L de cada solución de los extractos y fracciones previamente preparados a una concentración de 20mg/mL en metanol.

Posteriormente se realizó la corrida cromatográfica utilizando como fase móvil una mezcla de los solventes orgánicos cloroformo y metanol en proporción 9:1. Al finalizar la corrida cromatográfica se procedió con la revelación de la placa de sílica gel utilizando una lámpara de luz UV (366nm y 254nm) y luego mediante la aplicación del revelador vainillina-H₂SO₄ al 3%.

IV.2.3.3. Sub-Fraccionamiento de las fracciones activas

Las fracciones activas contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* fueron subfraccionadas mediante cromatografía líquida de mediana presión (MPLC) en una columna preparativa de sílica gel 60 (fase normal, Merck) con una bomba BÜCHI C-605 acoplada a un controlador BÜCHI C-615. Para ello, se pesó 30g de sílica gel 60 y se colocó en la columna para formar una fase compacta.

Seguidamente se eluyó preliminarmente la columna para acondicionarla con una solución de metanol:agua en una proporción 98:2 con un flujo de 15mL/min. Luego, se colocaron las fracciones activas previamente absorbidas en 5 gramos de sílica gel 60 y se estableció el flujo a 5 mL/min alimentando el sistema con el mismo eluyente metanol:agua a las proporciones 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 9:1 y 1:0.

De manera continua se fueron colectando las subfracciones y evaluándolas en placas de TLC de fase normal para luego unir las según su perfil cromatográfico. A continuación, una vez unidas las fracciones, se evaporó el solvente utilizando el rotaevaporador (BÜCHI B-480).

IV.2.3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones y/o subfracciones por bioautografía

Las fracciones obtenidas a partir del extracto DCM del hongo *S. brevicaulis* fueron evaluadas a nivel de su actividad contra *A. hydrophila* utilizando el método de bioautografía estandarizado en nuestro laboratorio (Correa et al., 2019).

La técnica de la bioautografía nos permitió detectar de manera cualitativa la zona donde se ubica el potencial compuesto antimicrobiano presente en mezclas complejas como lo es un extracto o una fracción semipurificada (Suleimana et al., 2009). Para ello, utilizamos la técnica denominada bioautografía de inmersión o bioautografía con capa de agar realizada de dos maneras: La primera se denomina bioautografía por punto o “dot-blot” y la segunda se denomina bioautografía con corrida de solventes en placas de TLC.

Se evaluó la actividad de las bandas corridas en la placa de TLC contra la bacteria patógena *A. hydrophila* ATCC 7966. La revelación del crecimiento bacteriano se realizó utilizando el reactivo MTT o Sal de Tetrazolio de color amarillo que se convirtió a un compuesto Formazán de color azul por acción de enzimas Oxido reductasas presentes en las mitocondrias de células vivas (Rahalison et al., 1991).

La bioautografía por punto permitió observar rápidamente si el extracto o fracción tuvo actividad antimicrobiana. Para ello, 5µl conteniendo 100µg de la muestra fue sembrado por triplicado en placas de TLC Sílica Gel 60 F-254 (fase normal). Se utilizó como control positivo 0.25µg de Tetraciclina sembrada en un volumen de 5µl en metanol. Luego de la siembra, las placas de TLC fueron colocadas bajo luz UV durante 15 minutos para su esterilización. Posteriormente, sobre las placas de TLC estéril se colocaron 5mL de un cultivo fresco *A. hydrophila* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se esperó hasta su solidificación y se incubó a 37°C por 24 horas. Terminado este tiempo de incubación, se procedió a revelar las placas con MTT a una concentración de 5mg/mL en PBS 0.01M a un pH de 7.4.

La bioautografía con corrida en placas de TLC permitió observar rápidamente las bandas activas luego de ser separadas parcialmente. Para ello, se sembraron en dos placas de TLC Sílica Gel 60 F254 un volumen de 5µl de una muestra conteniendo 100µg de la fracción activa. Posteriormente, las placas de TLC fueron colocadas en un depósito de vidrio conteniendo la fase móvil cloroformo y metanol en proporción 9:1 y se dejó correr el sistema hasta que el solvente alcance el frente del solvente previamente marcado. Una vez terminada la corrida cromatográfica, se extrajeron las placas y se secaron con aire caliente. Ambas placas se colocaron por separado en una placa Petri estéril sin tapa y fueron esterilizadas con luz UV por 15 minutos. Finalmente, una de las placas de TLC fue inoculada con 5mL de un cultivo fresco de la bacteria patógena *A. hydrophila* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, se incubó a 37°C por 24 horas y finalmente fue revelado con MTT a 5mg/mL en PBS 0.01M a un pH de 7.4. La otra placa de TLC conteniendo la fracción activa

corrida por cromatografía fue revelada utilizando una lámpara de luz UV (366nm y 254nm) y luego mediante la aplicación del revelador vainillina-H₂SO₄ al 3%.

Para ambos casos de bioautografía por punto y por corrida cromatográfica se consideraron los siguientes controles:

* Placa control de crecimiento bacteriano: Consiste de una placa de TLC que pasó por el proceso de corrida con solventes. Luego, en esta placa sin extractos o fracciones, se le agrega agar conteniendo a la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

* Placa control de esterilidad: Consiste de una placa de TLC que pasó por el proceso de corrida con solventes. Luego, en esta placa sin extractos o fracciones se le agrega agar libre de la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

IV.2.4. Evaluación de la citotoxicidad y cálculo del Índice de Selectividad de fracciones activas frente a la bacteria *Aeromonas hydrophila*

En esta etapa experimental se procedió con la evaluación de la citotoxicidad de las fracciones activas frente a células de la línea celular de macrófagos de ratón Raw Cells 264.7. Esta evaluación de la citotoxicidad proporcionó información sobre los posibles efectos adversos de las fracciones evaluadas. En este contexto se decidió enfrentar las células Raw Cells 264.7 contra diferentes concentraciones de las fracciones y posteriormente se reportó su efecto inhibitorio a nivel de la división celular. Estos efectos inhibitorios permitieron determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de las fracciones activas.

Finalmente, se realizó el cálculo del Índice de Selectividad (IS) debido a que fue un componente esencial en la evaluación de la actividad biológica de las fracciones

activas contra *A. hydrophila* obtenidas a partir del hongo *S. brevicaulis*. Este índice se basa en la relación entre dos parámetros críticos: la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), que indica la concentración mínima del compuesto necesaria para inhibir el total crecimiento de la bacteria *A. hydrophila*, y la Concentración Inhibitoria Media en células (IC₅₀), que representa la concentración del mismo compuesto que inhibe en un 50% la multiplicación de las células de la línea celular Raw Cells 264.7.

La importancia de calcular el IS radicó en su capacidad para proporcionar una evaluación precisa de la selectividad de los compuestos bioactivos hacia los microorganismos patógenos en comparación con las células huésped. Un IS mayor a 10 indica una selectividad significativa, lo que sugiere que el compuesto en cuestión tiene una capacidad antimicrobiana efectiva con una toxicidad limitada hacia las células huésped (Ndjakou Lenta et al., 2007; Ilic et al., 2013). Este concepto fue fundamental para respaldar la aplicabilidad potencial de compuestos preliminarmente identificados en las fracciones o subfracciones activas en entornos terapéuticos o como agentes antimicrobianos.

IV.2.4.1. Cultivo de la línea celular Raw Cells 264.7

La línea celular de macrófagos de ratón Raw Cells 264.7 fue mantenida mediante repique continuo en frascos de cultivo celular de 25 cm² estériles utilizando medio de cultivo RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, Glutamina al 1% y antibióticos Penicilina (100U/ml) y Estreptomina (100µg/ml). Las células fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron repicadas al alcanzar un 80% de confluencia mediante tripzinización y luego

1×10^6 células/ml fueron transferidas a un nuevo frasco de cultivo celular de 25cm^2 que contenía 5ml de medio de cultivo RPMI suplementado e incubadas a 37°C y 5% CO_2 hasta su uso.

IV.2.4.2. Evaluación de la citotoxicidad

Se realizó un ensayo de citotoxicidad en el 3er pasaje de células Raw Cells 264.7 en el cual se evaluó la concentración de las fracciones o subfracciones que inhiben el 50% del crecimiento de las células. Este ensayo consistió en sembrar 1×10^5 células/ml en una placa de 96 pozos en un volumen final de $100 \mu\text{L}$ de medio de cultivo suplementado y se incubaron por 24 horas a 37°C en presencia de 5% de CO_2 . Posteriormente, se inocularon las fracciones en concentraciones decrecientes partiendo de $1000 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron las células por 48 horas a 37°C en presencia de 5% de CO_2 . Se utilizaron como drogas de referencia la Anfotericina B y Tetraciclina a concentraciones decrecientes partiendo de $20 \mu\text{g/ml}$ y $100 \mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad mediante un ensayo de viabilidad utilizando la sal de tetrazolio (MTT) de color amarillo que en presencia de células viables se convierte en una sal de formazán insoluble de color azul. Para ello, se colocó en cada pozo de la placa de 96 pozos el volumen de $10 \mu\text{L}$ de MTT a la concentración de 10mg/ml disuelto en PBS 0.01M y se incubaron las placas de 96 pozos en ausencia de luz por un tiempo de 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 . La reacción bioquímica fue detenida mediante la incorporación de $100 \mu\text{L}$ de una solución de lisis (50% Isopropanol v/v, 10% SDS p/v disuelto en agua destilada), se

homogenizó el formazán y se leyó la absorbancia a 570nm utilizando un lector de ELISA (TECAN infinite 200 Pro, Suiza)

Para la determinación de la IC₅₀ se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de las fracciones, subfracciones y drogas de referencia. Los porcentajes de inhibición fueron obtenidos mediante la siguiente fórmula:

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

Donde Ac es la absorbancia del control de crecimiento de la línea celular Raw Cells en ausencia de las fracciones y Am es la absorbancia de la de la línea celular Raw Cells expuesta a las fracciones. Por último, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) fue determinada utilizando la plantilla PROBIT en Excel para Windows 10.

IV.2.4.3. Cálculo del Índice de Selectividad (IS)

Se calculó el Índice de Selectividad (IS) mediante la división de la Concentración inhibitoria media obtenida sobre la línea celular de macrófagos de ratón Raw Cells 264.7 (IC₅₀) y la Concentración que inhibe el total crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila* (MIC). Un valor de IS mayor a 10 indica una actividad selectiva sobre la bacteria patógena con una baja citotoxicidad sobre las células.

IV.2.5. Determinación de las moléculas activas mediante Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masas de Alta Resolución (HRMS)

Las fracciones activas contra *A. hydrophila* fueron analizadas con el Cromatógrafo Líquido de Ultra Resolución (Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000) (UPLC) acoplado al equipo de Espectrometría de Masas de alta resolución (Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus Orbitrap™) (HRMS) con el objetivo de realizar un

análisis de la diversidad de las moléculas presentes en las fracciones y subfracciones activas, así como determinar sus pesos moleculares.

Para ello se pesó 1mg de la subfracción activa y se disolvió en 50µL de metanol grado masas (ultrapuro) y se colocó en viales de vidrio especiales para realizar análisis de masas. El manejo del equipo UPLC-HRMS, la obtención de los datos de la espectrometría y su análisis fue realizado por el Dr. Billy Cabanillas de la Unidad de Productos Naturales en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La diversidad de compuestos presentes en las fracciones fue examinada por el UPLC-HRMS en modo de ionización positiva y la red molecular se construyó con el programa MZmine 2 y las bases de datos Dictionary of Natural Products (DNP), Metabolite and Tandem MS Database (MetLin) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), para hallar la fórmula molecular y su identificación más probable de la o las moléculas activas (Pluskal et al., 2012).

IV.3. Consideraciones éticas

Este trabajo de investigación fue sometido al comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y fue exonerado de revisión debido a que no se trabaja con animales o humanos.

IV.4. Plan de análisis

Este plan de análisis tuvo como objetivo garantizar una evaluación rigurosa y estadísticamente sólida de los datos obtenidos en la investigación, permitiendo una interpretación precisa de la actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones o subfracciones y su impacto en la línea celular de macrófagos de ratón.

Para ello, todos los experimentos biológicos se llevaron a cabo en triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Los halos de inhibición del crecimiento de *Aeromonas hydrophila* obtenidos a partir del método de cocultivo con los microorganismos previamente aislados del tracto digestivo de la mosca BSF fueron expresados como promedios \pm desviación estándar.

Para el análisis de los valores de los potenciales antimicrobianos observados en los enfrentamientos de los hongos contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 se emplearon enfoques estadísticos adecuados dependiendo de la distribución de los datos.

Primero, se realizó una prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk para verificar si los datos seguían una distribución normal. En caso de que los valores siguieron una distribución normal, se llevaron a cabo análisis paramétricos. Estos incluyeron un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para detectar diferencias significativas entre los promedios de los grupos. Por otro lado, si los valores no se ajustaban a una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas. Para datos no pareados, se empleó la prueba de Rango-Suma de Wilcoxon o la prueba U de Mann-Whitney, mientras que para múltiples grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis se realizaron utilizando el software R.

Además, se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos y se determinaron la Concentración que Inhibe el 50% de la población bacteriana (IC_{50}), la Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el total crecimiento bacteriano (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida que elimina el 99.9% de los

microorganismos viables (MBC), así como, la Concentración Inhibitoria Media (IC_{50}) sobre la línea celular de macrófago de ratón Raw Cells 264.7. Estos cálculos se realizaron utilizando una plantilla PROBIT en Excel 2016.

V. RESULTADOS

V.1. Evaluación de la actividad antagónica de hongos levaduriformes y filamentosos contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*

Se realizó el cultivo y la evaluación antagónica de hongos levaduriformes y filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de la mosca soldado negra (BSF) contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

V.1.1. Cultivos de hongos levaduriformes previamente aislados del tracto digestivo de *Hermetia illucens*

Se realizaron los cultivos de cepas de hongos levaduriformes previamente aislados del tracto digestivo de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) en agar Sabouraud y Caldo BHI. La lista de cepas de hongos levaduriformes cultivados está descrita en el anexo 2 en donde se puede observar que se cultivaron 8 cepas de *Pichia kudriavzevii*, 4 cepas de *Candida glabrata*, 1 cepa de *Stephanoascus ciferrii*, 3 cepas de Trichosporonales no clasificados y 1 cepa de *Candida pseudorugosa*.

V.1.2. Pruebas de enfrentamiento entre los hongos levaduriformes y la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*

Se realizaron pruebas de enfrentamiento de 17 cepas de hongos levaduriformes aislados del tracto digestivo de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 utilizando el método de cocultivo. En la tabla 1 se muestran los resultados de diámetros de inhibición y potencial antimicrobiano de las cepas de hongos levaduriformes evaluados contra la bacteria patógena para peces *A. hydrophila*. En este trabajo se observó que una cepa de *Pichia kudriavzevii* tuvo el mayor potencial antimicrobiano (PA = 1.8) mientras que

4 cepas de *Candida glabrata* mostraron un PA entre 1.4 y 1.6. Ninguna cepa de *Stephanoascus ciferrii*, *Trichosporonales* no clasificados y *Candida pseudorugosa* tuvieron actividad antagonica contra la bacteria *A. hydrophila* (PA = 1).

Tabla 1: Diámetro de inhibición y potencial antimicrobiano de hongos aislados del tracto digestivo de *H. illucens* contra la bacteria patógena para peces *A. hydrophila*

Código de la cepa fúngica	Especie	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano (PA)
HGS11_1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	9 ± 0.6	1.8 ± 0.1
HGS11_2	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1 ± 0
HGS11_3	<i>Candida glabrata</i>	7 ± 0.4	1.4 ± 0.1
HGS11_4	<i>Candida glabrata</i>	8 ± 0.4	1.6 ± 0.1
HGS11_5	<i>Pichia kudriavzevii</i>	7 ± 0.3	1.4 ± 0.2
HGS11_6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1 ± 0
HGS11_7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1 ± 0
HGS11_8	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1 ± 0
HGS11_9	<i>Candida glabrata</i>	7 ± 0.3	1.4 ± 0.1
HGS11_12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1.0 ± 0
HGS11_13	<i>Candida glabrata</i>	5 ± 0	1.1 ± 0
HGS11_14	<i>Pichia kudriavzevii</i>	5 ± 0	1.0 ± 0

HGM11_6	<i>Stephanoascus ciferrii</i>	5 ± 0	1.0 ± 0
HGM11_9	<i>Trichosporonales</i> no clasificados	5 ± 0	1.0 ± 0
HGM11_10	<i>Trichosporonales</i> no clasificados	5 ± 0	1.0 ± 0
HGM11_11	<i>Trichosporonales</i> no clasificados	5 ± 0	1.0 ± 0
HGM11_13	<i>Candida pseudorugosa</i>	5 ± 0	1.0 ± 0
Tetraciclina	-	14 ± 0.1	2.8 ± 0.1

Dónde: PA se obtuvo dividiendo el halo de inhibición entre el diámetro del disco. Las cepas de hongos levaduriformes activos muestran un $PA > 1$ mientras que las cepas de hongos levaduriformes no activos muestran un $PA = 1$. Se utilizó el antibiótico Tetraciclina a 30µg/disco como droga de referencia.

V.1.3. Cultivos de hongos filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de *Hermetia illucens*

Se realizaron los cultivos de 9 cepas de hongos filamentosos aislados del tracto digestivo de la mosca *Hermetia illucens* en agar Sabouraud y Caldo BHI. La lista de cepas de hongos filamentosos cultivados está descrita en el anexo 3 en donde se puede observar el cultivo de 3 cepas de *Aspergillus* sp., 4 cepas de *Scopulariopsis brevicaulis*, 1 cepa de *Chrysosporium multifidum* y 1 cepa de *Penicillium janthinellum*.

V.1.4. Pruebas de enfrentamiento entre los hongos filamentosos y la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*

Se realizaron pruebas de enfrentamiento de 9 cepas de hongos filamentosos aislados del tracto digestivo de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 utilizando el método de cocultivo. En la tabla 2 se muestran los resultados de diámetros de halos de inhibición y potencial antimicrobiano de las cepas de hongos filamentosos evaluados contra *Aeromonas hydrophila*. En este trabajo se observó que todas las cepas de hongos filamentosos tuvieron actividad antagónica ($PA > 1$) contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*. Así mismo, se observó que 2 cepas de hongos del género *Aspergillus* sp. tuvieron la mayor actividad antagónica con un valor de PA de 1.8, seguido de *Scopulariopsis brevicaulis* con un rango de PA entre 1.2 y 1.6 y *Chrysosporium multifidum* con un PA de 1.3.

Tabla 2: Diámetro de inhibición y potencial antimicrobiano (PA) de los hongos filamentosos previamente aislados del tracto digestivo de *H. illucens* contra la bacteria patógena para peces *A. hydrophila*

Código de la cepa fúngica	Especie	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano (PA)
HGU11_2	<i>Aspergillus</i> sp.	38.6 ± 1.3	1.8 ± 0.1
HGU11_3	<i>Aspergillus</i> sp.	39.1 ± 4.0	1.8 ± 0.1

HGU11_4	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	20.5 ± 1.3	1.5 ± 0.2
HGU11_5	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	25.1 ± 1.6	1.6 ± 0.2
HGU11_6	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	22.4 ± 2.7	1.5 ± 0.1
HGU11_7	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	19.3 ± 3.6	1.2 ± 0.3
HGU11_8	<i>Chrysosporium multifidum</i>	41.9 ± 3.6	1.3 ± 0.2
HGU11_10	<i>Penicillium janthinellum</i>	24.8 ± 2.9	1.5 ± 0.2
HGU11_11	<i>Aspergillus sp.</i>	29.5 ± 1.4	1.3 ± 0.1
Tetraciclina	-	26.4 ± 0.7	2.8 ± 0.1

Dónde: PA se obtuvo dividiendo el halo de inhibición entre el diámetro de crecimiento del hongo filamentoso. Las cepas de hongos filamentosos activos muestran un $PA > 1$ mientras que las cepas de hongos filamentosos no activos muestran un $PA = 1$. Se utilizó el antibiótico Tetraciclina a 30 μ g/disco de 5mm como droga de referencia.

V.2. Preparación de 3 cultivos de hongos con mayor actividad antagónica, obtención de extractos crudos y evaluación de su actividad antimicrobiana contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

Se prepararon 3 cultivos independientes de 500mL de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp. cepa HGU11_3, *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 y *Chrysosporium multifidum* cepa HGU11_8 debido a su mayor actividad contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* determinada por el método de cocultivo (Tabla 2). Luego de que cada hongo filamentosos fuera incubado por 5 días a 30°C se procedió con la obtención de 3 extractos crudos utilizando los solventes orgánicos Acetato de Etilo (AE), Diclorometano (DCM) y Metanol (MeOH). Finalmente, cada extracto crudo de AE, DCM y MeOH fue evaluado para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀), la Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el total crecimiento bacteriano (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida que elimina el 99.9% de los microorganismos viables (MBC) de la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

V.2.1. Obtención de los extractos crudos de AE, DCM y MeOH a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* con mayor actividad antagónica contra *Aeromonas hydrophila*.

Se obtuvieron los extractos de Acetato de etilo (AE), Diclorometano (DCM) y Metanol (MeOH) a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* siguiendo los pasos descritos en IV.2.2.2 y anexo 4a. En el anexo 4b se presentó la cantidad obtenida de extractos AE, DCM y MeOH destacándose la presencia de una mayor

producción de los extractos MeOH con respecto los extractos AE y DCM con pesos de 276, 444 y 1277mg de las especies de hongos *Aspergillus* sp. (cepa HGU11_3), *S. brevicaulis* (cepa HGU11_4) y *C. multifidum* (cepa HGU11_8) respectivamente. Así mismo, se observó que a partir de la especie del hongo filamentosos *S. brevicaulis* se obtuvo la menor cantidad de extracto DCM (30.5mg).

V.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos AE, DCM y MeOH por la técnica de microdilución en caldo

Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* con el objetivo de determinar la concentración que inhiba el 50% de crecimiento bacteriano (IC_{50}), la Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe el total crecimiento bacteriano (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida que elimina el 99.9% de los microorganismos viables (MBC) (Tabla 3).

Los resultados presentados en la tabla 3 demuestran que el hongo más activo fue *S. brevicaulis* cuyo extracto diclorometano presentó una IC_{50} de 0.3mg/mL y una MIC de 0.5mg/mL, mientras que el hongo menos activo fue la especie *Chrysosporium multifidum* con valores de IC_{50} , MIC y MBC mayores a la concentración máxima evaluada (4mg/ml). En el caso del hongo del género *Aspergillus* se obtuvieron valores similares de IC_{50} y de MIC para los extractos Acetato de etilo y diclorometano respectivamente. Finalmente, el extracto metanólico de las 3 especies de hongos no presentó actividad antimicrobiana a la concentración máxima evaluada (4mg/ml). El antibiótico de referencia Tetraciclina presentó una IC_{50} de 0.3 μ g/mL y una MIC y MBC de 0.5 μ g/mL.

Tabla 3: Determinación de la IC₅₀, MIC y MBC de los extractos obtenidos a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Chrysosporium multifidum* activos contra la bacteria patógena *A. hydrophila*.

Cepa fúngica	Extracto	IC₅₀ (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Aspergillus sp.</i> (HGU11_3)	AE	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.0	>4.0
	DCM	1.8 ± 0.05	2.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
	MeOH	>4.0	>4.0	NE
<i>S. brevicaulis</i> (HGU11_4)	AE	1.5 ± 0.03	2.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
	DCM	0,3 ± 0.01	0,5 ± 0.0	>1.0
	MeOH	>4.0	>4.0	NE
<i>C. multifidum</i> (HGU11_8)	AE	>4.0	>4.0	NE
	DCM	>4.0	>4.0	NE
	MeOH	>4.0	>4.0	NE
Tetraciclina (µg/mL)		0,3 ± 0.01	0,5 ± 0.0	0.5 ± 0.0

Dónde: AE: Extracto de acetato de etilo; DCM: Extracto de diclorometano; MeOH: Extracto de metanol, IC₅₀: Concentración inhibitoria media; MIC: Concentración mínima inhibitoria; MBC: Concentración mínima bactericida; NE: No evaluado.

A partir de estos resultados se decidió trabajar con el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* debido a que no hay información bibliográfica describiendo su rol antagonico contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*.

V.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto DCM del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* por la técnica de bioautografía

Se evaluó la actividad del extracto diclorometano del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 mediante la técnica de Bioautografía por corrida de solvente (Figura N°4). En esta figura se observa una primera placa de sílica gel en fase normal que fue revelada con luz UV 254nm, UV 366nm y Vainillina (Figura 4A, 4B y 4C respectivamente) y la segunda placa a la que se le colocó una capa de agar conteniendo a la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*. La flecha naranja grande indica la zona de inhibición por Bioautografía revelada con Sal de tetrazolio (MTT), las flechas naranjas pequeñas indican la zona donde podrían ubicarse los compuestos activos contra *Aeromonas hydrophila*.

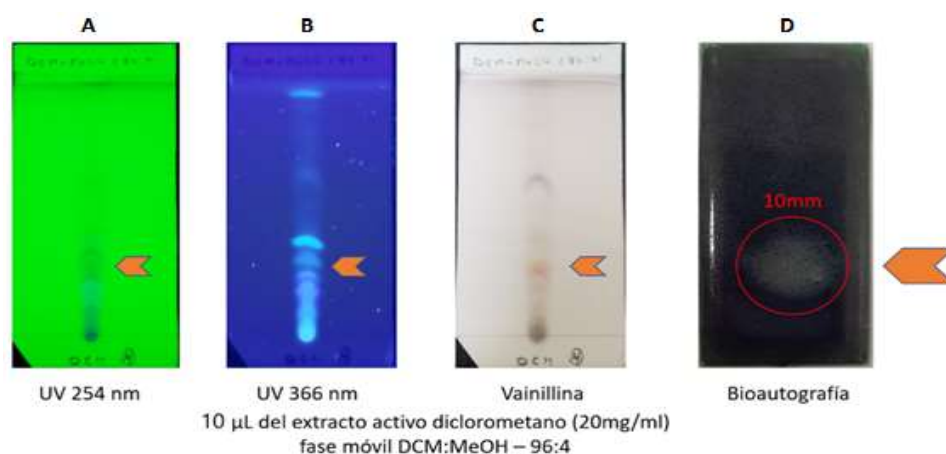


Figura 4: Evaluación de la actividad anti-*Aeromonas* del extracto diclorometano del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 mediante la técnica de Bioautografía por corrida de solvente.

A partir de los resultados de actividad del extracto DCM de *Scopulariopsis brevicaulis* observados por bioautografía se decidió producir mayor cantidad de dicho extracto. Para ello, se cultivaron 25L del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 siguiendo la metodología descrita en el punto IV.2.2.1. Luego se procedió con la obtención del extracto crudo utilizando el solvente orgánico Diclorometano descrita en el punto IV.2.2.2. Finalmente, Se logró obtener 1500 miligramos del extracto DCM el cual fue almacenado a 4°C hasta su fraccionamiento.

V.3. Obtención de fracciones y subfracciones a partir del extracto crudo diclorometano del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 y la evaluación de la actividad contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir de 1500 miligramos del extracto crudo diclorometano se realizó el fraccionamiento siguiendo la metodología descrita en el punto IV.2.3.2. En total se logró obtener 11 fracciones presentados en el anexo 5. Con respecto a los pesos, se obtuvo la mayor cantidad en la fracción A (740mg), seguido de la fracción M (329mg) y la E (52.9mg), otras fracciones tuvieron masas menores a 42mg siendo la fracción I la que menor cantidad se obtuvo (5.6mg).

Luego de realizar la actividad antimicrobiana mediante la técnica de bioautografía por punto (Figura 5) se obtuvieron los diámetros de los halos de inhibición en donde se observó que las fracciones M, D y E presentaron actividad antimicrobiana de las cuales las fracciones D y E mostraron mayor actividad con diámetros de halos de inhibición de 8.3 y 8.7mm respectivamente y mayor claridad del halo (Figuras 5B

y 5C respectivamente). El antibiótico de referencia Tetraciclina generó un halo de inhibición de 14mm de diámetro con una claridad de 3 cruces (Figura 5D).

En la figura 6 se presentan los resultados del diámetro de inhibición de los extractos más activos (Figura 6A) con sus respectivos porcentajes de inhibición (Figura 6B).

En la figura 6A se observa que el extracto E fue el más activo produciendo un halo de inhibición de 8.7mm de diámetro, seguido del extracto D con 8.3mm de diámetro y finalmente el extracto M con 5.3mm de diámetro. Estas 3 fracciones produjeron un porcentaje de inhibición del crecimiento del 55.1%, 52.5% y 33.5% respectivamente con respecto al antibiótico de referencia Tetraciclina.

A partir de estos resultados se decidió continuar con el subfraccionamiento de las fracciones más abundantes (M y E) activos contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

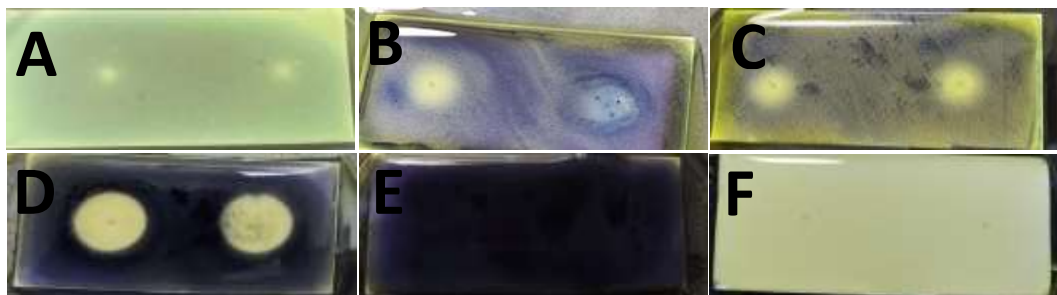


Figura 5. Prueba de Bioautografía de las fracciones M (A), D (B) y E (C) más activas sobre la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Se utilizó la droga de referencia Tetraciclina (D), un control de crecimiento de la bacteria (E) y un control negativo sin bacteria (F).

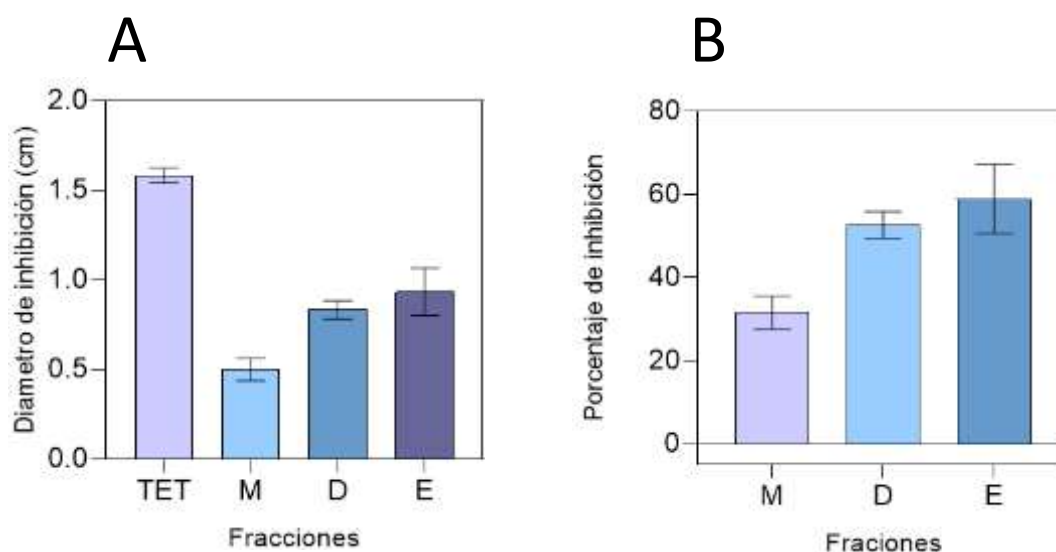


Figura. 6. Diámetro de inhibición de las fracciones más activas y la Tetraciclina (A) y porcentaje de inhibición de las fracciones con respecto a la Tetraciclina (B).

V.3.1. Subfraccionamiento de la fracción M y evaluación de la actividad contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir de 329mg de la fracción M se continuó con el proceso de subfraccionamiento obteniéndose un total de 14 subfracciones presentados en el anexo 6. Posteriormente se realizó una bioautografía por punto y se observó que las subfracciones M4, M8 y M9 fueron activas contra *A. hydrophila* ATCC 7966 (Figura 7A, 7B y 7C respectivamente). El antibiótico de referencia Tetraciclina generó un halo de inhibición de 14.8mm de diámetro con una claridad equivalente a 3 cruces (+++).

En la figura 8 se presentan los resultados del diámetro de inhibición de las subfracciones más activas (Figura 8A) con sus respectivos porcentajes de inhibición (Figura 8B). En la figura 8A se observa que la subfracción M9 fue el más activo produciendo un halo de inhibición de 6mm de diámetro, seguido de las

subfracciones M4 y M8 ambos con 3mm de diámetro. Estas 3 subfracciones produjeron un porcentaje de inhibición del crecimiento del 38.2%, 20.2% respectivamente con respecto al antibiótico de referencia Tetraciclina.

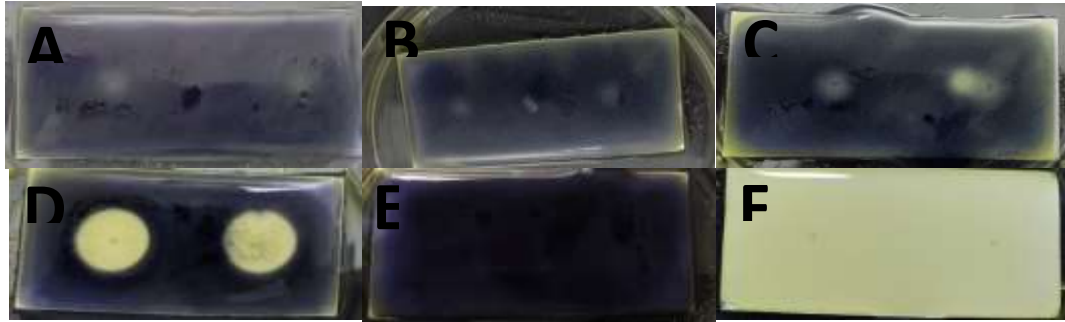


Figura 7. Prueba de Bioautografía de las subfracciones M4 (A), M8 (B) y M9 (C) más activas sobre la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Se utilizó el antibiótico de referencia Tetraciclina (D), un control de crecimiento de la bacteria (E) y un control negativo sin bacteria (F).

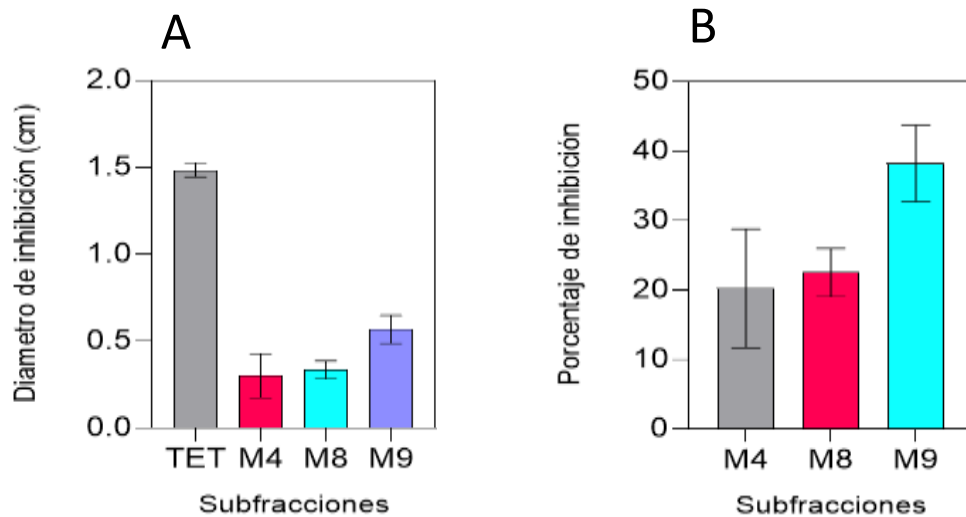


Figura 8. Diámetro de inhibición de las subfracciones más activas y la Tetraciclina (A) y porcentaje de inhibición de las subfracciones con respecto a la Tetraciclina (B).

V.3.2. Subfraccionamiento de la fracción E activo contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir de 52.9mg de la fracción E se continuó con el proceso de subfraccionamiento obteniéndose un total de 13 subfracciones presentados en el anexo 7. Posteriormente se realizó una bioautografía por punto y se observó que las subfracciones E1, E2, E4 y E7 fueron activas contra *A. hydrophila* ATCC 7966 (Figura 9). El antibiótico de referencia Tetraciclina generó un halo de inhibición de 18.3mm de diámetro con una claridad equivalente a 3 cruces (+++).

En la figura 10 se presentan los resultados del diámetro de inhibición de las subfracciones más activas (Figura 10A) con sus respectivos porcentajes de inhibición (Figura 10B). En la figura 10A se observa que la subfracción E7 fue el más activo produciendo un halo de inhibición de 14.2mm de diámetro, seguido de la subfracción E2 con 7.5mm de diámetro, E1 con 4.8mm de diámetro y E4 con 3.8mm de diámetro. Estas 4 subfracciones produjeron un porcentaje de inhibición del crecimiento del 75.3%, 39.8%, 25.7% y 20.3% respectivamente con respecto al antibiótico de referencia Tetraciclina.

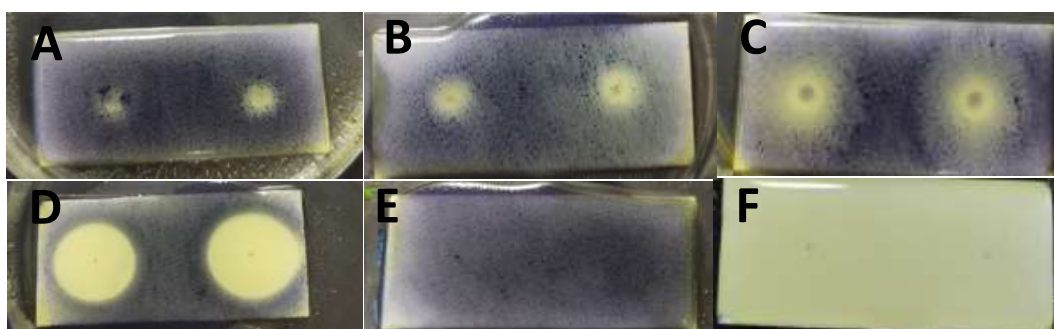


Figura 9. Prueba de Bioautografía de las subfracciones E1 (A), E2 (B) y E7 (C) más activas sobre la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Se utilizó la droga de referencia

Tetraciclina (D), un control de crecimiento de la bacteria (E) y un control negativo sin bacteria (F).

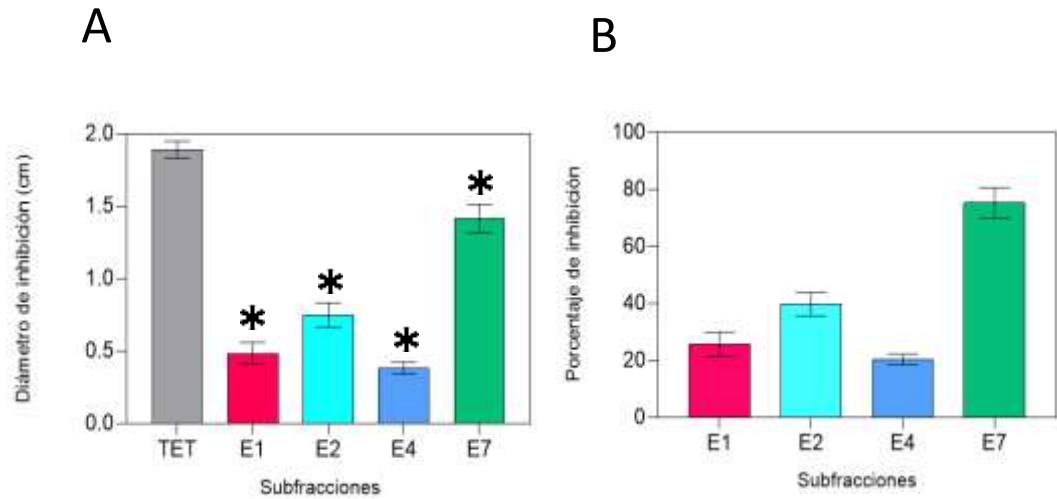


Figura 10. Diámetro de inhibición de las subfracciones más activas y la Tetraciclina (A) y porcentaje de inhibición de las subfracciones con respecto a la Tetraciclina (B). *: Indica un valor $P < 0.05$ con respecto al control Tetraciclina (TET)

Los resultados obtenidos hasta este punto permitieron determinar que las subfracciones más activas del extracto DCM del hongo *S. brevicaulis* corresponden a los derivados de la fracción E (E1, E2, E4 y E7), sin embargo, la poca cantidad en miligramos de las subfracciones más activas E2 y E7 no permitieron continuar con el aislamiento de la o las moléculas activas contra *A. hydrophila*. Ante ello se decidió realizar un segundo cultivo en masa del hongo *S. brevicaulis* para realizar un fraccionamiento biodirigido e identificar las potenciales moléculas implicadas en la actividad antimicrobiana.

V.4. Obtención de fracciones y subfracciones a partir de un segundo lote de extracto crudo diclorometano producido a partir del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 activo contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir de 522 miligramos del extracto crudo diclorometano se realizó el fraccionamiento siguiendo la metodología descrita en el punto IV.2.3. En total se logró obtener 9 fracciones presentados en el anexo 8. Con respecto a los pesos, se obtuvo la mayor cantidad en la fracción 3 (181mg), seguido de la fracción 4 (160.3mg) y la fracción 9 (94.3mg), otras fracciones tuvieron masas menores a 23mg siendo la fracción 2 la que menor cantidad se obtuvo (1.5mg).

Luego de realizar la actividad antimicrobiana mediante la técnica de bioautografía por punto, se obtuvieron los diámetros de los halos de inhibición. En la figura 10 se observa que las fracciones 1, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 presentaron actividad antimicrobiana de las cuales las fracciones 4, 5 y 6 presentaron la mayor actividad antimicrobiana con diámetros de halos de inhibición de 12.3, 16.3 y 11.3mm respectivamente. El antibiótico de referencia Tetraciclina generó un halo de inhibición de 19.1mm de diámetro con una claridad de 3 cruces.

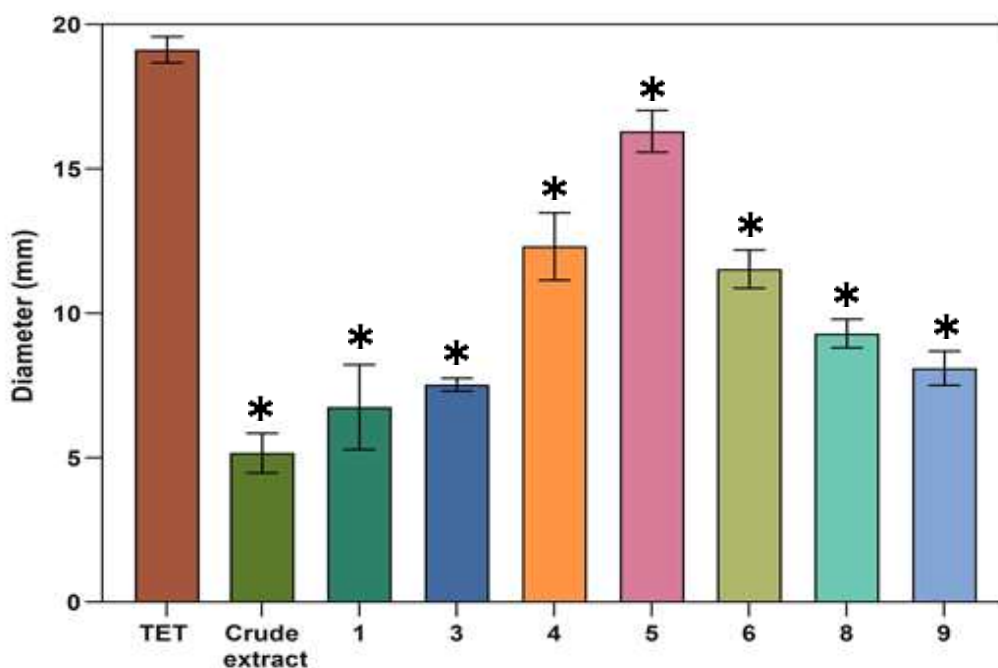


Figura 11. Diámetro de inhibición de las fracciones más activas del segundo lote de extracto DCM proveniente de un cultivo del hongo *S. brevicaulis* activo contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*. La Tetraciclina fue el antibiótico de referencia. *:
Indica un valor $P < 0.05$ con respecto al control Tetraciclina (TET)

A partir de estos resultados se decidió continuar con el subfraccionamiento de la fracción 4 debido a que fue la más abundante y activa contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

V.4.1. Subfraccionamiento de la fracción 4 y evaluación de la actividad contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*

A partir de la fracción 4 se continuó con el proceso de subfraccionamiento obteniéndose un total de 7 subfracciones (Tabla 4). Posteriormente se realizó una bioautografía por punto y se observó que las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 fueron activas contra *A. hydrophila* ATCC 7966 de las cuales las subfracciones 4.5 y 4.6

presentaron la mayor actividad antimicrobiana con diámetros de halos de inhibición de 15 y 16mm respectivamente. La droga de referencia Tetraciclina generó un halo de inhibición de 18.1mm de diámetro con una claridad equivalente a 3 cruces (+++).

Tabla 4: Determinación de la actividad biológica de 7 subfracciones de la fracción 4 sobre la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966 mediante el método de bioautografía por punto.

Subfracciones	Masa muestra (mg)	Diámetro de halo (mm)	Claridad del halo
4.1	4.1	ND	ND
4.2	1.9	ND	ND
4.3	2.9	ND	ND
4.4	3.0	ND	ND
4.5	28.2	16.3	+++
4.6	20.0	14	+
4.7	70.8	6.1	++
Tetraciclina	-	20.7	+++

Dónde: (+) indica la claridad baja del halo, (++) indica la claridad media del halo, (+++) indica la claridad alta del halo en relación a la Tetraciclina (+++), ND No determinado por tener poca cantidad (mg) de la subfracción.

V.5. Análisis de la citotoxicidad de fracciones y subfracciones activas contra *Aeromonas hydrophila* frente a la línea celular de macrófagos de ratón Raw Cells 264.7 y cálculo del Índice de Selectividad (IS)

Se realizó un ensayo de citotoxicidad de las fracciones 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y subfracciones 4.5, 4.6, 4.7, E1, E2, E4, E7, M4 y M8 con la línea celular de macrófago de ratón Raw Cells 264.7, se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para las células, la mínima concentración que inhibe el total crecimiento de *A. hydrophila* (MIC) y se calculó el Índice de Selectividad (Tabla 5). En la tabla 5 se observó que, de las 17 fracciones evaluadas a nivel de su citotoxicidad, un total de 9 fracciones mostraron baja citotoxicidad con valores de IC₅₀ ≥ 1000µg/ml. De estas 9 fracciones menos citotóxicas, las fracciones 4, 5, 9, 4.5, 4.6 y 4.7 mostraron actividad contra la bacteria *A. hydrophila* con valores de MIC de 250, 125, 500, 125, 500 y 62.5µg/ml respectivamente. Finalmente, al realizar el análisis de las fracciones menos citotóxicas sobre la línea celular de macrófago de ratón Raw Cells y más activas contra la bacteria *A. hydrophila* se observó que las fracciones 4.5, 4.7 y 5 presentaron los mayores valores de índice de selectividad con valores de 8, >16 y >8 respectivamente.

Tabla 5: Determinación de la citotoxicidad en Raw Cells 264.7, la actividad contra *A. hydrophila* ATCC 7966 y el índice de selectividad de subfracciones de *S. brevicaulis*.

Fracciones / Subfracciones	IC ₅₀ en Raw Cells 264.7 (µg/ml)	MIC en <i>A. hydrophila</i> (µg/ml)	Índice de Selectividad (IS)
E.1	>100	100 ± 0.0	>1
E.2	>500	500 ± 0.0	>1
E.4	>1000	1000 ± 0.0	>1
E.7	>500	250 ± 0.0	>2
M4	500 ± 79	500 ± 0.0	1
M8	>1000	>1000	1
1	>1000	>1000	1
3	450 ± 86	1000 ± 0.0	<1
4	>1000	250 ± 0.0	>4
5	>1000	125 ± 0.0	>8
6	900 ± 114	250 ± 0.0	4
7	304 ± 52	500 ± 0.0	1
8	781 ± 75	250 ± 0.0	3
9	>1000	500 ± 0.0	>2
4.5	1000 ± 45	125 ± 0.0	8
4.6	>1000	250 ± 0.0	>4

4.7	>1000	62.5 ± 0.0	>16
Tetraciclina	>100	0.5 ± 0.0	>200
Anfotericina B	10.4 ± 1.0	ND	ND

Dónde: ND indica No Determinado, IS se calculó dividiendo el valor de IC₅₀ de citotoxicidad sobre el valor del MIC.

V.6. Análisis de compuestos

Se realizó una primera exploración de la diversidad de compuestos presentes en las fracciones D y E del extracto crudo DCM del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* cepa HGU11_4 mediante UPLC-HRMS en modo de ionización positivo. Se construyó la red molecular empleando el software de la plataforma de la GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>). En la evaluación preliminar de ambas fracciones se lograron anotar 14 compuestos, entre ellos: derivados del ácido cólico, dipéptidos y lipopéptidos. Asimismo, se identificó un grupo de compuestos que corresponderían a lipopéptidos no descritos previamente (Figura 12).

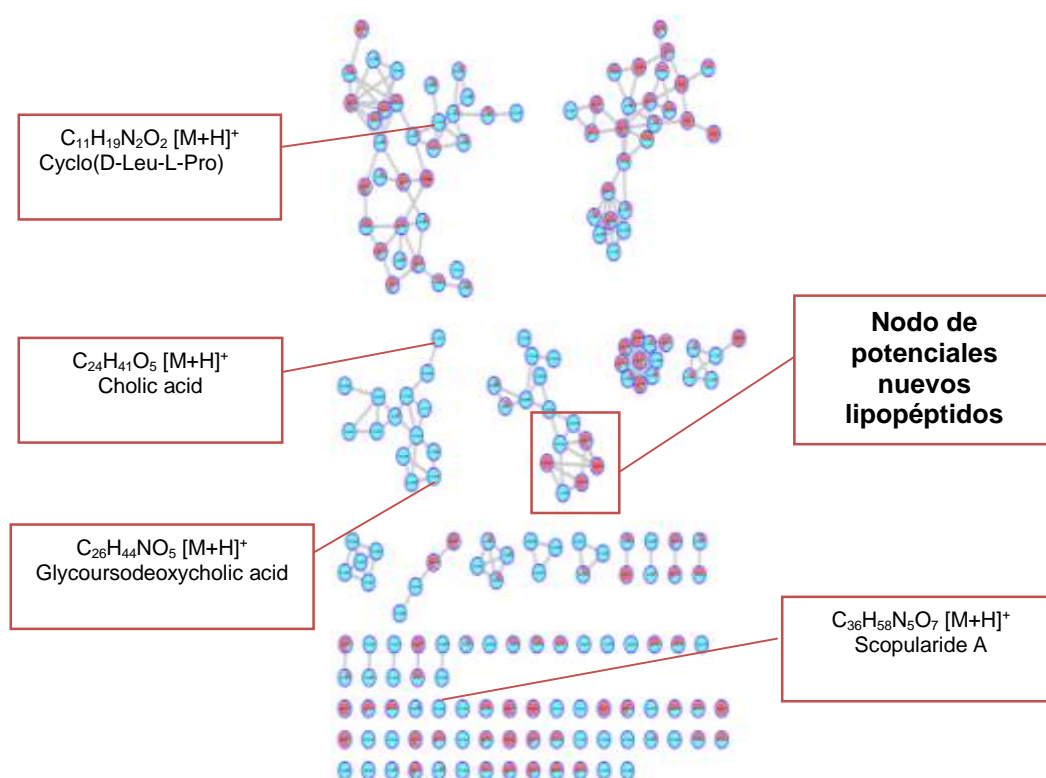


Fig. 12. Red molecular de las fracciones D (rojo) y E (celeste) indicando algunos de los compuestos anotados en el análisis preliminar de su composición química.

A partir de las fracciones obtenidas en un segundo lote producido del extracto DCM se realizó una segunda exploración de la diversidad de compuestos mediante un análisis comparativo de redes moleculares de las fracciones 6, 8 y 9. En este análisis se observó la presencia de moléculas que pertenecían a compuestos de tipo Escopularidas en las 3 fracciones, siendo detectado en mayor cantidad en las fracciones 8 y 9. Además, se identificó que uno de esos compuestos coincide con la Escopularida A en la base de datos (Figura 13A, Anexo 9A). En el caso de las moléculas de tipo Surfactinas, éstas se encuentran sólo en la fracción 9 y se observó que uno de los nodos coincide en la base de datos con la surfactina A (peso molecular 1008.7), mientras que los otros dos forman parte de la familia de las Surfactinas (figura 13B).

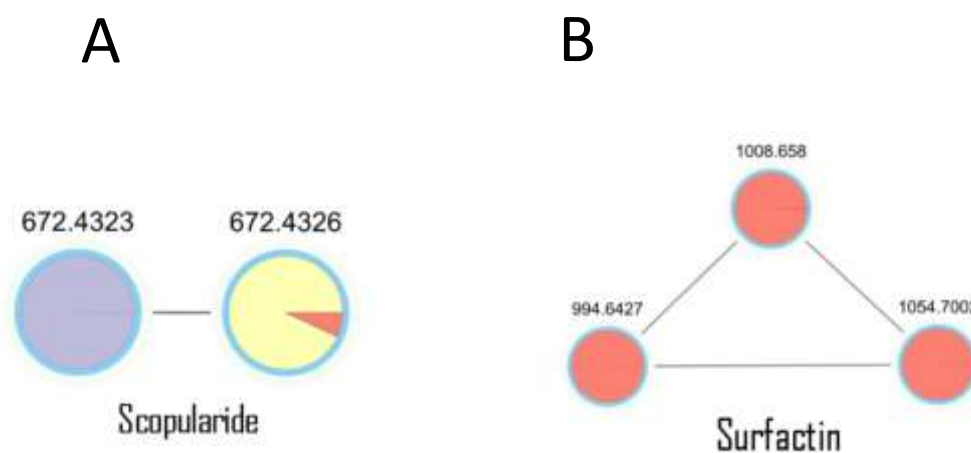


Figura 13. Red molecular de las fracciones 6 (amarillo), 8 (púrpura) y 9 (rojo) mostrando algunos compuestos identificados como Escopularidas (A) y Surfactinas (B) en el análisis preliminar de su composición química.

En el caso de las moléculas derivadas del ácido cólico, éstos están presentes en las fracciones 8 y 9 en mayor cantidad y se observó una menor presencia en las fracciones 5 y 6. La mayoría de los nodos no coinciden en la base de datos con

ningún compuesto conocido, sin embargo, se ha observado que son compuestos relacionados con el ácido cólico (Figura 14A, Anexo 9B). Por último, el clúster de moléculas de tipo dipéptidos muestra que éstos están presentes en 4 fracciones analizadas, estando presentes en gran proporción en la fracción 5, fracción que presenta la mayor actividad. Los compuestos que coinciden con la base de datos son dipéptidos cíclicos que presentan prolina como uno de los aminoácidos, compuestos que forman derivados de piperazina (Figura 14B, Anexo 9C y 9D).

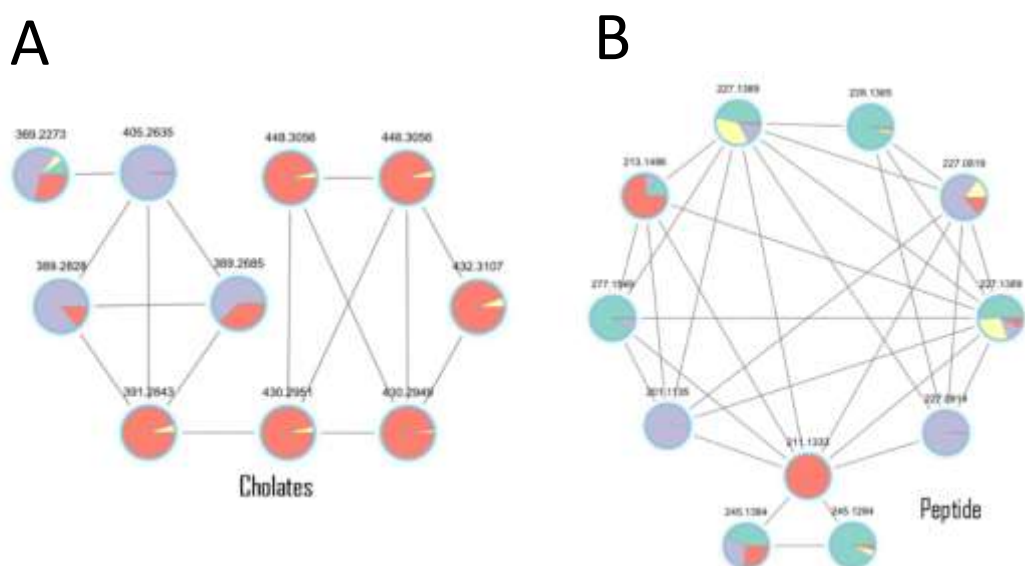


Figura 14. Red molecular de las fracciones 5 (verde), 6 (amarillo), 8 (púrpura) y 9 (rojo) mostrando algunos compuestos identificados como derivados de Acido Cólico (A) y Dipéptidos (B) en el análisis preliminar de su composición química.

Un análisis GNPS de las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7, con actividad antimicrobiana reportadas en las tablas 4 y 5, permitió observar la presencia de moléculas de la familia de las Escopularidas, dipéptidos y N-acetiltiramina. Con respecto a las moléculas de la familia de las Escopularidas, estas se encontraron principalmente en la subfracción 4.7 (rojo). En esta red molecular se logró detectar la presencia de la Escopularida A y B con pesos moleculares de 672 y 644 respectivamente. Así

mismo, se lograron identificar la presencia de otras Escopularidas no conocidas con pesos moleculares de 630, 642, 658, 670 y 675 (Figura 15).

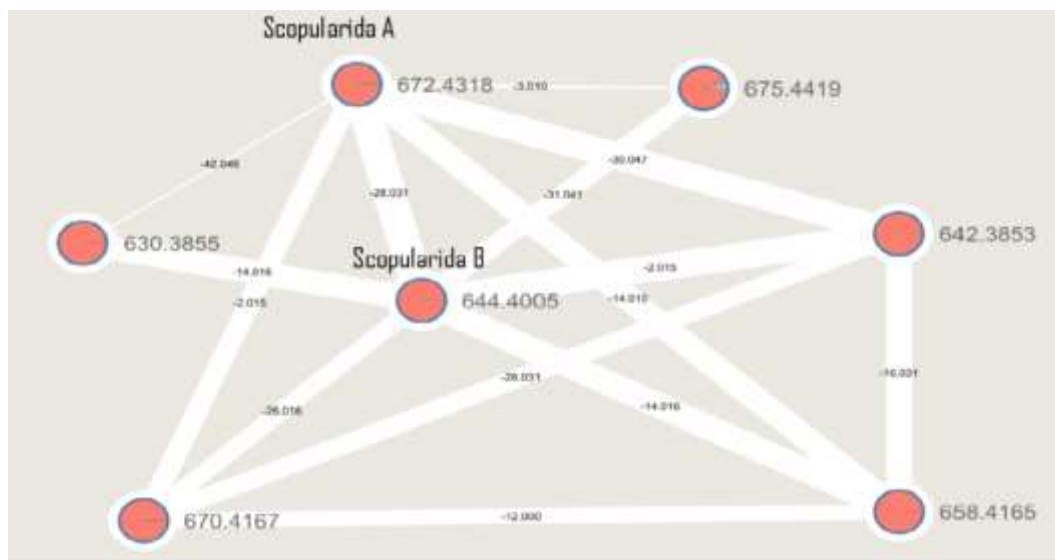


Figura 15 Red molecular de las subfracciones 4.6 (celeste) y 4.7 (rojo) mostrando los compuestos identificados como Escopularidas A y B y otras potenciales nuevas Escopularidas.

Las estructuras moleculares de la Escopularida A y la Escopularida B encontradas en la subfracción 4.7 se presentan en la figura 16. En estas estructuras moleculares se puede observar que la secuencia de aminoácidos corresponde a L-Phe-L-Ala-D-Leu-L-Val-Gly. A partir de esta estructura molecular logramos identificar las potenciales estructuras de las Escopularidas desconocidas (Figuras 17 y 18).

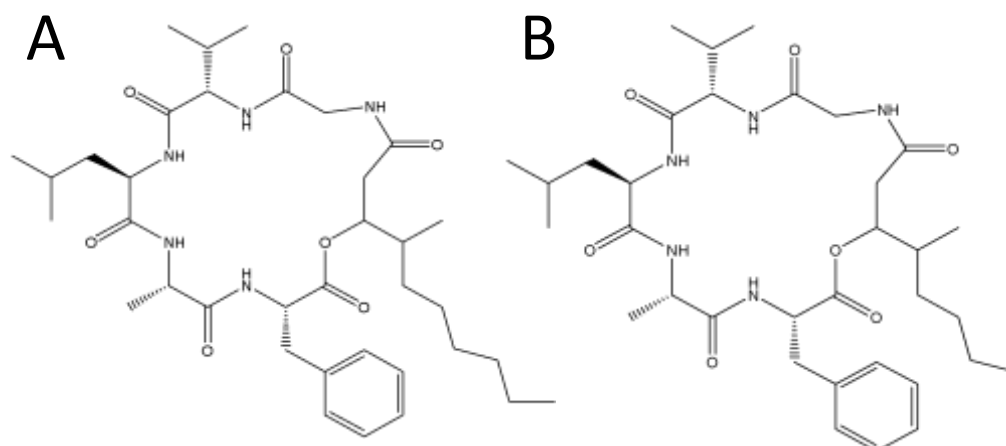


Figura 16. Estructura de la Escopularida A con peso molecular de 672 (A) y Escopularida B con peso molecular de 644 (B).

El análisis de los patrones de fragmentación de la Escopularida de masa molecular 630 permitió generar la hipótesis de que esta molécula puede existir reemplazando el aminoácido Alanina presente en la Escopularida B por el ácido Aminobutírico generando una potencial estructura presentada en la figura 17A.

Con respecto a la Escopularida de peso molecular 658, consideramos que esta estructura se origina por un aumento de un grupo metilo (PM = 14) marcado en rojo en la cadena de ácido graso de la Escopularida B (Figura 17B).

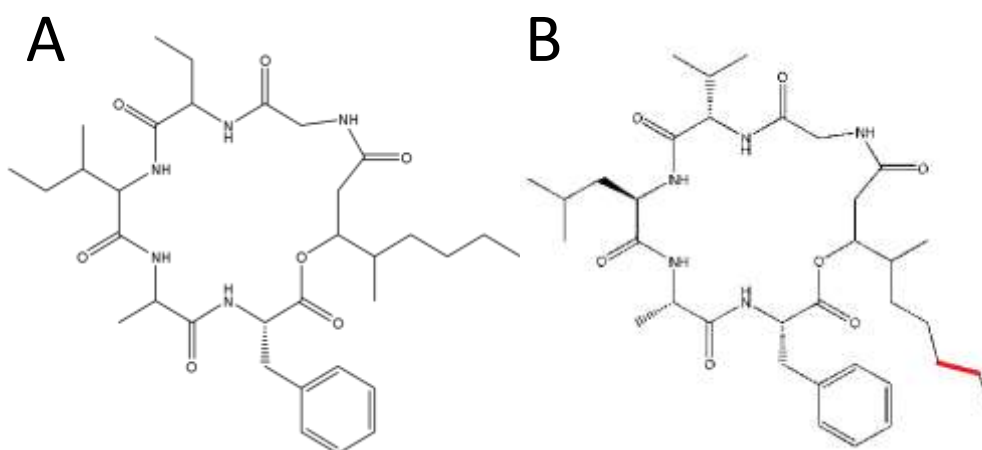


Figura 17. Potenciales estructuras de las Escopularidas de peso molecular 630 (A) y 658 (B) obtenidos a partir de la estructura patrón de la Escopularida B (PM = 644).

Con respecto a las Escopularidas de peso molecular 670 y 642, consideramos que ambas moléculas pueden existir si se forma un doble enlace y se eliminan dos hidrógenos de la cadena de ácido graso presentes en las Escopularidas A y B respectivamente. En la figura 18 se presentan las moléculas de masa 670 (A) y 642 (B) resaltando en rojo a la cadena de ácido graso donde puede formarse el doble enlace.

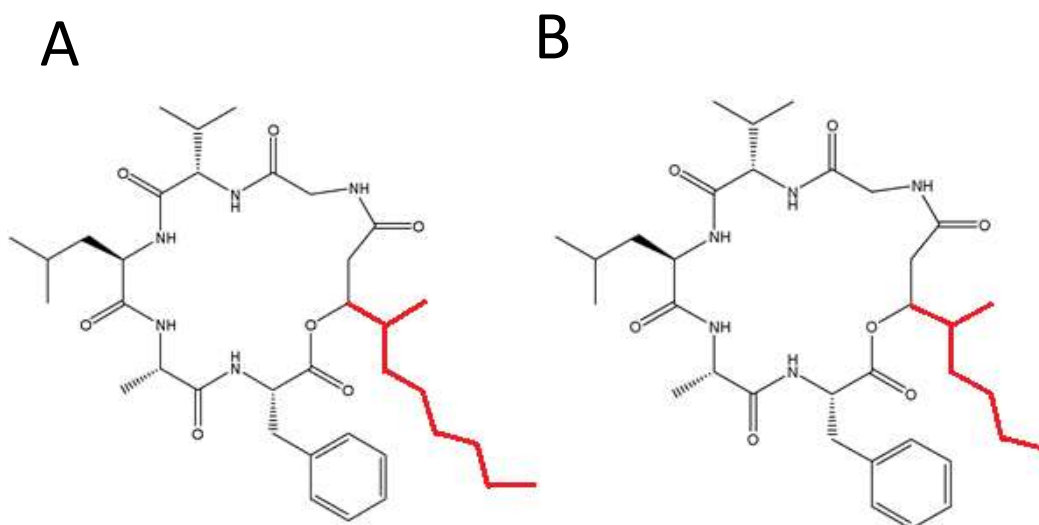


Figura 18. Estructura de la Escopularida A con peso molecular de 672 (A) y la Escopularida B con peso molecular de 644(B) resaltando en rojo la zona de una posible formación de un doble enlace.

Continuando con el análisis de las redes moleculares, se observó la presencia de 11 dipéptidos en las subfracciones activas 4.5, 4.6 y 4.7 (Tabla 6). Luego de realizar un análisis de los aminoácidos implicados en la estructura de los dipéptidos observamos que los dipéptidos Cyclo-(L-Leu-L-Pro) y Cyclo-(Val-Phe) estaban presentes solo en las subfracciones 4.5 y 4.7 respectivamente. Además, en la mayoría de dipéptidos presentes en dos fracciones se observó la presencia del aminoácido Prolina.

Tabla 6: Lista de dipéptidos identificados presentes en las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 activas contra la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966.

Secuencia de aminoácidos	Peso molecular (PM)	Presencia del dipéptido en la subfracción		
		4.5	4.6	4.7
Cyclo-(L-Val-L-Pro)	197.1	X	X	
Cyclo-(glycyl-L-phenylalanine)	205.1		X	X
Cyclo-(L-Leu-L-Pro)	211.1	X		
Cyclo-(Leu-Leu)	227.2	X	X	X
Cyclo-(L-Leu-L-4-hydroxy-Pro)	227.1	X	X	X
Cyclo-(L-Phe-D-Pro)	245.1	X	X	X
Cyclo-(Val-Phe)	247.1			X
Cyclo-(tyrosyl-prolyl)	261.1	X	X	X
Cyclo-(Phe-Leu)	261.1	X	X	X
Cyclo-(L-Trp-L-Pro)	284.1	X	X	
Cyclo-(D-Trp-L-Pro)	284.1	X	X	

Finalmente, logramos identificar la presencia de la N-acetiltiramina (PM = 180). Esta molécula derivada de la tirosina estuvo presente mayoritariamente en la

subfracción 4.5 (amarillo) seguido de la subfracción 4.6 y 4.7 (morado y rojo respectivamente) (Figura 19).

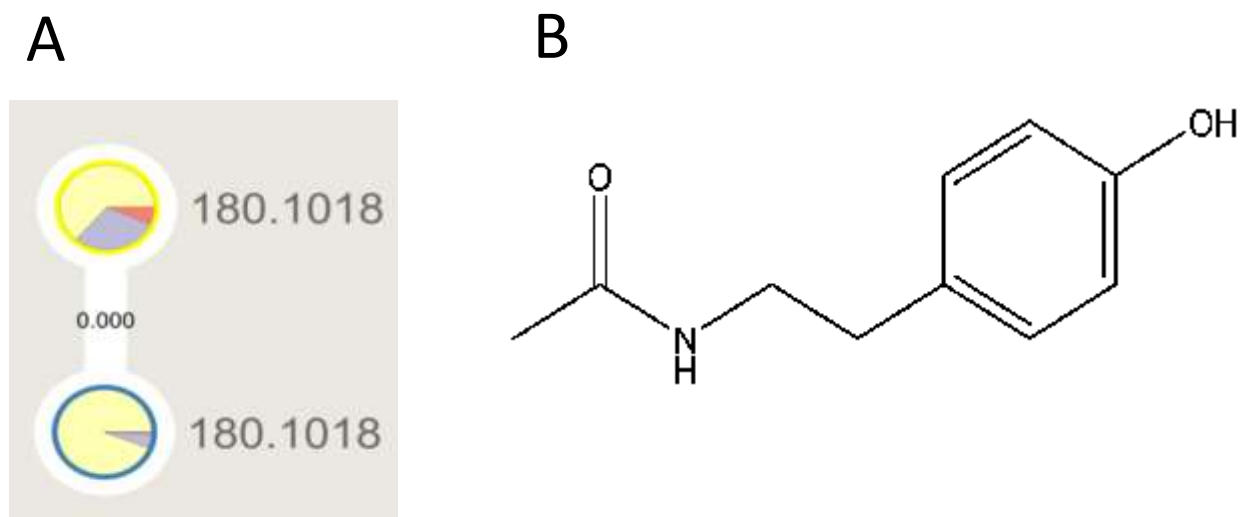


Figura 19. Red molecular de las subfracciones 4.5 (amarillo), 4.6 (morado) y 4.7 (rojo) mostrando la distribución de la N-acetiltiramina (A) y su estructura molecular (B).

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de los hongos (micobiota) previamente aislados del tracto digestivo de la larva de la mosca *H. illucens*. Esta micobiota está conformada por diversas levaduras y hongos filamentosos muy poco estudiados por lo que presenta una potencial fuente de microorganismos con capacidad de liberar sustancias antimicrobianas contra diversas cepas bacterianas resistentes a antibióticos, incluyendo *Aeromonas hydrophila* causante de grandes problemas en la industria acuícola.

El trabajo inicio con el cultivo de los hongos para su caracterización macroscópica y microscópica y su preservación en diferentes medios y temperaturas. De acuerdo con los resultados, las diversas cepas de los hongos fueron recuperados correctamente, ya que poseían las mismas características morfológicas a nivel de colonia y a nivel individual tal como fueron reportadas anteriormente en el estudio de Correa (2018). Además, los resultados también concuerdan con los datos de Varotto Bocazzi et al. (2017), en donde la mayoría de las especies de hongos aislados fueron del tipo levaduras y el único hongo filamentosos fue *Geotrichum candidum*.

Posteriormente se realizó la búsqueda de hongos productores de compuestos con actividad antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 evaluados por del método de cocultivo o “Agar Slab” modificado. Durante la exploración del rol antagónico se observó que dos especies *Candida glabrata* y *Pichia kudriavzevii* mostraron halos con mediana transparencia contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (Tabla 1). Estudios anteriores reportan que muchas levaduras del género *Candida* y *Pichia* producen moléculas activas con perfil antifúngico, bactericida y

bacteriostático entre las que se encuentra *Candida bombicola* quien produce glucolípidos extracelulares, llamados soforolípidos, que poseen actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (Shah et al., 2007; Cavalero & Cooper, 2003). Mientras *Candida intermedia* aislada de fuentes lácteas reduce el crecimiento bacteriano de *L. monocytogenes* y *Kluyveromyces marxianus* (Goerges et al., 2006). Los reportes de Chen et al. (2015) indicaron que *Candida tropicalis* tuvo una actividad moderada con *Escherichia coli*. Añadiendo a esto, otro estudio menciona la actividad inhibitoria de *Candida intermedia* contra el patógeno *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Acuña-Fontecilla et al., 2017). Por último, Correa (2018) demostró la actividad antimicrobiana de *Candida glabrata* con halos catalogados tenues, es decir, con menor efecto inhibitorio contra *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Nuestros resultados confirman que *Candida glabrata* posee una actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas, en nuestro caso la inhibición del crecimiento de *Aeromonas hydrophila*, mostraron halos con mayor transparencia comparado con la bacteria patógena *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 reportada anteriormente (Correa, 2018).

Por otro lado, hace algunos años se demostró la actividad antimicrobiana de *P. kudriavzevii* mediante la producción de una toxina asesina que inhibía el crecimiento de diversas bacterias patógenas de importancia para la salud como *Enterococcus faecalis* y *S. aureus* (Gram positivas), y *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* (Gram negativas) (Bajaj et al., 2013). Además, Correa (2018) reportó la actividad antagónica de esta cepa levaduriforme aislada del tracto digestivo de las larvas *Hermetia illucens* contra *S. Typhimurium*, mostrando halos de inhibición de transparencia media. No obstante,

no mostró actividad inhibitoria con *S. aureus* una cepa bacteriana Gram positiva. Nuestros resultados confirman la actividad antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila*, una bacteria Gram negativa, con halos de inhibición catalogados con transparencia media.

Otras especies de levaduras constituidas por las especies *Candida pseudorugosa*, *Stephanoascus ciferrii* y *Trichosporonales* no clasificadas, no mostraron actividad antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Sin embargo, estas levaduras son conocidas por ser productoras de toxinas asesinas, que actúan contra otras levaduras de perfil sensible ya sea del mismo género u otras especies, debido a la competencia de nutrientes y espacios limitados (Lim et al., 2011). Añadiendo a esto, según los estudios recientes de Correa (2018) se observó una actividad antimicrobiana de estas cepas contra la bacteria *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, pero no presentaron actividad contra *S. Typhimurium*.

Las cepas de *Aeromonas hydrophila* son resistentes a la mayoría de los β -lactámicos, incluidas ceftazidima y cefepima (Janda y Abbott, 2010). En otro estudio, Peretta et al. (2019) utilizaron los estándares de sensibilidad del CLSI, quienes reportaron los diámetros de inhibición, usando discos de agar de 6mm con 30 μ g de tetraciclina contra la bacteria patógena *A. hydrophila* ATCC 7966 (Figura 18). De esta manera, se utilizó esta información como referencia para validar nuestra metodología de evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos previamente aislados de la larva de la mosca *Hermetia illucens*, lográndose obtener rangos de halos de inhibición 18mm \pm 2mm con buena reproducibilidad.

Durante la evaluación de la actividad antagónica de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Chrysosporium multifidum* y *Penicillium janthinellum* se observó que las 4 especies tuvieron actividad antimicrobiana contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 con presencia de halos de inhibición con una claridad similar a la presentada en los halos de inhibición generados por el antibiótico de referencia Tetraciclina. El criterio de selección principal para avanzar a fases posteriores fue el Potencial Antimicrobiano (PA), considerando como significativo un valor de PA mayor a 1. Esto indicó una actividad inhibitoria considerable contra la bacteria patógena, estableciendo un punto de corte para identificar los hongos más prometedores. Todas las cepas mostraron actividad antagónica ($PA > 1$), destacándose las cepas de *Aspergillus* sp. con los valores más altos ($PA = 1.8$), seguido por *Scopulariopsis brevicaulis* ($PA = 1.2$ a 1.6) y *Chrysosporium multifidum* ($PA = 1.3$) (Tabla 2). Estos hallazgos dan a conocer que los hongos filamentosos producen moléculas antimicrobianas con mayor actividad antimicrobiana comparados con los hongos levaduriformes.

El género *Scopulariopsis* está conformado por hongos saprofitos comúnmente hallados en el suelo. Están presentes en diversos hábitats y se conocen 5 especies que están relacionadas con enfermedades en el ser humano: *S. acremonium*, *S. brevicaulis*, *S. brumptii*, *S. fusca* y *S. koningii* ocasionando dermatomicosis y onicomycosis (Cuenca-Estrella M et al. 2003) En este trabajo se destaca el uso del hongo filamentoso *S. brevicaulis* como potencial hongo productor de metabolitos antagónicos contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Para lograr una caracterización preliminar de los potenciales metabolitos antagónicos, utilizamos el método de extracción líquido-líquido para fraccionar las

moléculas químicas que el hongo libera, de tal forma que se produjeron extractos crudos de las cepas seleccionadas utilizando Acetato de Etilo (AE), Diclorometano (DCM), y Metanol (MeOH). Los puntos de corte para la evaluación de estos extractos fueron definidos por sus valores de IC₅₀ menor a 1 mg/mL, indicando una alta actividad antimicrobiana, MIC menor a 2 mg/mL, indicando inhibición total del crecimiento bacteriano y MBC menor a 3 mg/mL, para la eliminación del 99.9% de microorganismos viables

El extracto DCM de *S. brevicaulis* presentó la mayor actividad antimicrobiana, con una IC₅₀ de 0.3 mg/mL y una MIC de 0.5 mg/mL, superando los puntos de corte establecidos y, por tanto, se decidió avanzar con este extracto en la siguiente fase. Por otro lado, los extractos metanólicos no mostraron actividad significativa a las concentraciones evaluadas, destacando la especificidad del solvente en la actividad antimicrobiana observada (Tabla 3). Por el contrario, en un estudio previo publicado por Correa et al (2019) se realizó el fraccionamiento del sobrenadante del hongo *Chrysosporium multifidum* aislado del tracto digestivo de la mosca BSF. En dicho trabajo se utilizaron diversos solventes de polaridad creciente de los cuales el solvente acetato de etilo permitió concentrar los metabolitos activos de *C. multifidum*.

Luego de determinar que el extracto crudo de diclorometano de *S. brevicaulis* fue el más activo contra *A. hydrophila*, se procedió con el fraccionamiento biodirigido de un primer lote de cultivo en masa del hongo. A partir de este fraccionamiento se logró obtener las fracciones M, D y E activas (Figura 6) de las cuales la fracción M y E continuaron con el proceso de subfraccionamiento por presentar mayor masa en miligramos (Anexo 5). Continuando con el subfraccionamiento se obtuvieron 14

subfracciones de la fracción M (Anexo 6) y 13 subfracciones de la fracción E (Anexo 7). Del total de subfracciones obtenidas hasta este punto se observó que la subfracción más activa fue la E7 con 14.2mm de diámetro de halo de inhibición lo que equivale a un porcentaje de inhibición del 75.3% con respecto al antibiótico de referencia Tetraciclina (Figura 10). La limitante que se tuvo en este punto fue que tuvimos 2.5mg de la subfracción E7 haciendo imposible seguir con un proceso de fraccionamiento biodirigido (Anexo 7). Ante esta dificultad decidimos producir un segundo lote del extracto diclorometano del hongo *S. brevicaulis* lográndose obtener 9 fracciones de las cuales la fracción 4 generó un halo de inhibición de 12.3mm (Figura 11) y con un peso de 160.3mg (Anexo 8). Finalmente, el subfraccionamiento de la fracción 4 permitió obtener 7 subfracciones siendo las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 las más activas con una masa suficiente para permitir continuar con el fraccionamiento (Tabla 4).

Posteriormente, se evaluó la actividad de las fracciones y subfracciones mediante el análisis de la MIC por microdilución en caldo (Tabla 5) y adicionalmente se evaluó la citotoxicidad sobre la línea celular de macrófago de ratón Raw Cells 264.7. Al obtener resultados de la MIC se observó que solo 2 fracciones fueron poco activas con un valor de MIC > 1000µg/ml. Este resultado demuestra que el método de Bioautografía anteriormente utilizado (Tablas 2, 3 y 4) para el bioguiaje fue idóneo y podría servir de referente para posteriores trabajos de investigación. Este tipo de bioguiaje utilizando la técnica de la Bioautografía fue ampliamente descrito por Choma et al. (2011) donde se destaca que la bioautografía en capa fina es un método rápido para el cribado químico y biológico de extractos. Si bien este tipo de metodología no permite obtener valores de MIC, es posible obtener valores

de diámetros de inhibición que sirven como referentes de actividad por lo que es una técnica sencilla para detectar sustancias antimicrobianas contra bacterias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Baluari et al., 2016). Además, en el trabajo publicado por Naveed et al. (2013) se resaltó el uso de la técnica de bioautografía para estudiar mas a fondo las actividades antibacterianas de aceites esenciales de comino (*Cuminum cyminum*), canela (*Cinnamomum verum*), cardamomo (*Amomum subulatum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) sobre las bacterias patógenas *Salmonella typhi* (D1 Vi-positiva), *Salmonella typhi* (G7 Vi-negativa), *Salmonella paratyphi A*, *Escherichia coli* (SS1), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580) permitiendo determinar la presencia de potenciales moléculas activas como el cuminaldehído, t-cinamaldehído, eucaliptol pues contenía un frente de corrida (Rf) comparable con su estándar de referencia. Finalmente, en los resultados presentados en las figuras 8 y 11 se observa que las fracciones M8 y 1 respectivamente presentan actividad contra *Aeromonas hydrophila* por el método de bioautografía, sin embargo, al realizar el análisis de la MIC (Tabla 5) observamos que no presentaron actividad a la máxima concentración evaluada obteniéndose una MIC > a 1000µg/ml. Estos resultados podrían deberse a la carga de una mayor concentración del compuesto bioactivo en la TLC (Naveed et al., 2013).

Así mismo, del total de fracciones y subfracciones evaluadas se observó que la fracción 4 tuvo una actividad moderada sobre *A. hydrophila* con una MIC de 250µg/ml, sin embargo, al realizarse el proceso de subfraccionamiento, se obtuvieron 3 subfracciones activas de las cuales la subfracción 4.7 fue la más activa contra *A. hydrophila* (MIC de 62.5µg/ml) y menos citotóxica (IC₅₀ > 1000µg/ml)

obteniéndose un índice de selectividad mayor de 16 (Tabla 5). Estos resultados demuestran la importancia de continuar con el fraccionamiento dirigido el cual permitirá concentrar la actividad del compuesto activo hasta llegar a purificarla y así determinar su actividad selectiva sobre el patógeno.

Durante todo este proceso de fraccionamiento y subfraccionamiento se logró concentrar los metabolitos activos. De esa forma, se decidió realizar un análisis comparativo de redes moleculares de productos naturales a nivel mundial (GNPS) de las fracciones y subfracciones activas contra la batería patógena para peces *Aeromonas hydrophila* mediante la comparación de datos de fragmentación de moléculas generados por espectrometría de masa (MS/MS) (Wang et al., 2016). Estos datos de fragmentación sumados a los datos de peso molecular obtenidos con el mismo equipo de masa permitieron encontrar moléculas previamente reportadas en el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* como las Escopularidas A y B, Surfactina y N-acetiltiramina, así como potenciales nuevas moléculas con actividad antimicrobiana de la familia de las Escopularidas y dipéptidos.

Con respecto a las Escopularidas, se observó la presencia de la Escopularida A en las fracciones D y E (Figura 12), además esta misma Escopularida fue detectada en las fracciones 6, 8 y 9 de un segundo lote de extracto diclorometano producido (Figura 13A). Además de ello, se observó la presencia mayoritaria de la Escopularida B y otras Escopularidas desconocidas en la subfracción 4.7 (Figura 15). Esta subfracción presentó una moderada actividad contra *A. hydrophila* generando un diámetro de inhibición de 6.1mm con 2 cruces y un MIC de 62.5µg/ml (Tablas 4 y 5 respectivamente). Esta presencia mayoritaria de una familia de Escopularidas podría explicar la razón de la actividad antimicrobiana

selectiva (IS > 16, Tabla 5) de dicha subfracción pues mostró una baja citotoxicidad con una IC₅₀ mayor de 1000µg/ml sobre la línea celular de ratón Raw Cells 264.7.

Coherentemente con los resultados de este estudio, varios autores han reportado la presencia del polipéptido Escopularida A en *Scopulariopsis brevicaulis*. Por ejemplo, en la esponja marina *Tethya aurantium*, asociada al hongo *S. brevicaulis*. Éste último sintetiza las Escopularidas A y B que exhiben actividad antimicrobiana contra patógenos (Agrawal et al., 2017; De Mandal et al., 2021; Wiese et al., 2011). En el trabajo de Elbanna et al. (2019) aislaron la Escopularida A a partir de *S. brevicaulis* del tracto digestivo de *Mugil cephalus* “lisa”. Sobre la base de un extracto etanólico de *S. brevicaulis* y empleando HPLC de fase reversa, obtuvieron Escopularidas A – H. Posteriormente, empleando estándares auténticos de Escopularida A y B, realizaron un análisis GNPS comparativo de extractos obtenidos de cultivos de *S. brevicaulis*, detectando un grupo de “Escopularida” que incorpora nodos de *Scopulariopsis sp* (Elbanna et al., 2019). Además, en el trabajo de Singab et al. (2023) encontraron en el hongo endofítico *Aspergillus flavus*, un asociado del coral blando *Sarcophyton ehrenbergi* Escopularidas A y B con actividad significativa contra *Helicobacter pylori*, con valores de MIC entre 7,8 y 15,6 µg/mL. También, la Escopularida A demostró ser potente contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, mientras que la Escopularida B inhibió específicamente a *C. albicans*.

También se ha reportado que dos moléculas aisladas de *Scopulariopsis brevicaulis*, la Escopularida A y B tienen actividad inhibitoria moderada sobre líneas tumorales pancreáticas Colo357 y Panc89 y del colon HT29 a una concentración de 10µg/mL. Sin embargo, no se observó actividad antimicrobiana en bacterias Gram negativas

como *Escherichia coli* y *Pseudomona fluorescens* y a Gram positivas como *Staphylococcus lentus* y *Bacillus subtilis* (Yu et al., 2008). De la misma forma, Long et al. (2021) identificaron en el hongo *Aspergillus sclerotiorum*, derivado de un coral blando, nuevos derivados de Escopularida, uno de estos derivados, la Escopularida I mostró una actividad inhibidora de la enzima acetilcolinesterasa con una IC₅₀ de 15.6 µM, así como citotoxicidad moderada contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano HONE-EBV con una IC₅₀ de 10.1 µM. Asimismo, se reporta que la Escopularida A no presenta actividad contra un aislado clínico resistente a la vancomicina *Enterococcus faecalis* (Elbanna et al., 2019). En este sentido, se recomienda realizar más investigaciones para explorar que otras bacterias u organismos patógenos son sensibles a éste lipopéptido.

Actualmente, no se han encontrado investigaciones sobre la actividad antibacteriana de la Escopularida A y B sobre *Aeromonas*, sin embargo, se ha venido trabajando en otros lipopéptidos con propiedades antimicrobianas contra *A. hydrophila*, como la Crustina, un péptido antibacteriano derivado de la hemolinfa de crustáceos que inhibe la capacidad de esta bacteria de formar biofilms (De Mandal et al., 2021).

Con respecto a la Surfactina, se observó su presencia solo en la fracción 9 de un segundo lote de extracto diclorometano producido (Figura 13B). La Surfactina es una molécula perteneciente a la familia de los Lipopéptidos que se caracteriza por tener una estructura de lactona cíclica con 7 aminoácidos unidos a un ácido graso beta-hidroxi de 13 a 15 carbonos (Lilge et al. 2022). Esta molécula actúa como un fuerte biosurfactante ampliamente utilizado en la industria porcina y avícola para combatir la enteritis necrótica causada por *Brachyspira hyodysenteriae* y

Clostridium perfringens respectivamente, (Horng et al., 2019). En el trabajo de Horng et al. (2019) se logró aislar la surfactina a partir de la bacteria *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* y se determinó su actividad antimicrobiana contra ambas bacterias patógenas *B. hyodysenteriae* y *C. perfringens* mediante el ensayo de Kirby Bauer obteniendo halos de inhibición máximos de 14 y 5mm respectivamente por lo que se le considera en este trabajo como un compuesto con mayor actividad sobre bacterias Gram negativas. Por otro lado, en un estudio realizado por Kim et al. (2009) se encontró que la Surfactina tuvo menor actividad contra un set de bacterias Gram negativas en comparación con el set de bacterias Gram positivas mediante el método de Kirby Bauer. Además, también se ha reportado la actividad antifúngica de nuevas surfactinas contra los hongos *Fusarium moniliforme* y *Candida*, hongos que parasitan cultivos de plantas como el maíz, trigo, frijol y tomates (Jiang et al., 2016; Sharma et al., 2020). De manera similar, en el trabajo de Abdelraof et al. (2024), evaluaron la capacidad antimicrobiana de una Surfactina optimizada, comparándola con agentes antibacterianos y antifúngicos estándar mediante el método de Kirby Bauer. Los resultados mostraron una inhibición significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* con halos de inhibición de 4, 5 y 4 mm respectivamente. Estos resultados fueron iguales o superiores a los obtenidos con Ciprofloxacino, un antibacteriano de referencia. Además, aunque la Surfactina mostró solo una inhibición ligera contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), tuvo una mayor actividad contra patógenos resistentes a antibióticos β -lactámicos como las cefalosporinas, que no lograron inhibir estos patógenos debido a la presencia de β -lactamasas. En este trabajo, también se

observó que la Surfactina tuvo un efecto antimicótico contra *Candida albicans* resistente a Fluconazol, un antifúngico estándar, con un diámetro de inhibición de 3 mm. Sin embargo, *Aspergillus niger* mostró resistencia a la Surfactina, destacando la necesidad de investigar la variabilidad en la susceptibilidad de diferentes especies fúngicas a este lipopéptido (Abdelraof et al., 2024). En la industria acuícola se viene evaluando la actividad de lipopéptidos tensioactivos o surfactantes como el lipopéptido H6 aislado de una bacteria del género *Pseudomonas*. Este lipopéptido ha demostrado en un modelo de infección *in vivo* de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con el protozoario patógeno *Ichthyophthirius multifiliis*, causante de la enfermedad de la mancha blanca en la trucha, lograr la reducción significativa de la enfermedad en peces tratados con este surfactante en comparación a un grupo no tratado (Li et al., 2022). Así mismo, en un trabajo realizado en el Perú en la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* aislada del tracto digestivo del paiche (*Arapaima gigas*), se llegó a observar que exudados de esta bacteria *B. amyloliquefaciens* contenidos en el extracto mostraron actividad antagónica contra las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas aeruginosa* con halos de inhibición mayores a 8mm. En este trabajo de investigación se utilizó la espectrometría de masas MALDI TOF para identificar la presencia de la surfactina en el extracto mediante el análisis de su proteoma celular y extracelular (Feria et al., 2019). Finalmente, en un trabajo reciente realizado por Barale et al. (2022) se aislaron y caracterizaron isoformas de surfactina a partir de la bacteria *Bacillus velezensis* activos contra dos bacterias patógenas para humanos *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Las técnicas descritas en este artículo utilizadas

para el aislamiento y caracterización de las surfactinas fueron similares a las realizadas en nuestro trabajo de investigación.

Todos estos resultados indican que los surfactantes lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus* o *Pseudomonas* presentan un fuerte potencial para futuras aplicaciones en el tratamiento de enfermedades causadas en animales de crianza masiva para el consumo humano incluyendo los peces (Buchmann 2022). Si bien esta molécula fue hallada en las fracciones activas de nuestro trabajo a partir del hongo filamentoso *Scopulariopsis brevicaulis*, sería necesario aislarla y purificarla en cantidades de alrededor de 10mg para lograr evidenciar su actividad sobre la bacteria Gram negativa *Aeromonas hydrophila* lo que conllevaría a un hallazgo novedoso puesto que no hay publicaciones relacionadas con esta actividad antimicrobiana y tampoco de su aislamiento a partir del hongo *S. brevicaulis*.

Con respecto a la N-acetiltiramina con un peso molecular de 180Da, se observó su presencia mayoritaria en la subfracción 4.5 y en menor proporción en las fracciones 4.6 y 4.7. Hasta este punto no pudimos verificar que esta molécula tenga actividad contra *Aeromonas hydrophila* pues faltaría purificarla en suficiente cantidad y evaluarla directamente en un ensayo de bioautografía. Sin embargo, en la bibliografía se hace referencia a que esta molécula presenta actividad inhibiendo la formación de un quórum sensing (QS) en una cepa de *Vibrio alginolyticus* (Reina et al., 2019). En otro estudio realizado por Driche et al. (2022) se aisló en suficiente cantidad la N-acetiltiramina de la bacteria *Streptomyces acrimycini* quien presentó una actividad antagónica contra bacterias patógenas multirresistentes. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana sobre las bacterias patógenas les permitió determinar una MIC de 30mg/ml para la N-acetiltiramina. Los pocos estudios sobre

esta molécula dan a entender que podría ser un interesante candidato para futuras investigaciones contra bacterias MDR. Es por ello que recientemente un grupo de investigación están interesados en generar una producción masiva de la N-acetiltiramina con el fin de utilizarlo como antitumoral, antitrombótica y, además, como antibacteriano (Pan et al., 2023).

Con respecto a los derivados de ácido cólico, estos compuestos fueron identificados en las fracciones 5, 6, 8 y 9 (Figura 14) y una familia de dipéptidos fueron encontrados en las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 (Tabla 6). En este punto no logramos identificar la estructura de una molécula conocida. Una revisión bibliográfica permitió entender que los derivados de ácido cólico pertenecen al grupo de los péptidos antimicrobianos (AMP por su sigla en inglés). Los AMPs en general son metabolitos secundarios con actividad biológica y suelen diferir en su secuencia y estructura, por ello tienen varias nomenclaturas por lo que se agrupan como cecropinas, defensinas y bacteriocinas. Estos AMPs tienen la característica de presentar conformaciones anfifílicas lo que les permite asociarse con la bicapa lipídica celular causando una desorganización y/o disrupción de la membrana de la bacteria (Savage & Li., 2000). Debido al creciente problema de resistencia antibacteriana en diversas especies de bacterias patógenas para el ser humano y para los animales, ha aumentado el interés en el uso de los péptidos antimicrobianos. Si bien es cierto los péptidos antimicrobianos de cadena larga son poco atractivos debido a su dificultad en sintetizarlos o su rápida degradación proteolítica, ahora se considera que los dipéptidos podrían jugar un rol más activo en la lucha contra las bacterias (Wu et al., 2022). A nivel de su actividad se ha reportado la capacidad antimicrobiana de un AMP aislado de *Lactobacillus acidophilus* sobre la bacteria

patógena para peces *Aeromonas hydrophila* por el método de difusión en disco. Además, también se reportó la actividad antimicrobiana de un extracto de *L. acidophilus* en un modelo de infección *in vivo* de peces cabeza de serpiente (*Channa striatus*) con *Aeromonas hydrophila*. De esta manera lograron aislar, caracterizar y validar la eficacia del AMP en la acuicultura pudiendo ser utilizado como un futuro fármaco contra infecciones causadas por *Aeromonas hydrophila* (Akter et al. 2020). En el trabajo realizado por Zhao et al. (2019) se observó la actividad de un nuevo péptido antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *Micrococcus luteus*) y bacterias Gram negativas (*A. hydrophila* y *E. coli*) y, además, lograron curar una infección por *Aeromonas hydrophila* en cangrejos de río destacando su potencial uso en la crianza de estos invertebrados y proporcionando un nuevo candidato para el desarrollo de agentes antimicrobianos terapéuticos para el control de enfermedades en el sector acuícola y en la salud humana. Por otro lado, se ha visto también que los péptidos antimicrobianos desempeñan un rol importante en el sistema inmune de los peces. En un estudio reciente realizado por Zhu et al. (2023) secuenciaron y caracterizaron la Hepsidina, un AMP rico en cisteína, con actividad antimicrobiana de amplio espectro y, además, observaron un efecto regulador del AMP sobre la flora intestinal del pez *Acrossocheilus fasciatus* (Cyprinidae) restaurando la composición de la flora intestinal causado por una infección previa con *Aeromonas hydrophila*. Sin embargo, la administración exógena de Hepsidina puede conllevar a una restricción excesiva del hierro, ya que esta hormona peptídica regula negativamente la ferroportina, el único canal conocido para la exportación de hierro desde las células hacia la circulación. Esta restricción reduce la disponibilidad de hierro para la

eritropoyesis, es decir, la producción de glóbulos rojos. Como resultado, se puede desarrollar anemia, comprometiendo así la capacidad del organismo para transportar oxígeno de manera eficiente (Ahmadi Badi et al., 2024).

Además, aunque el estudio de Zhu et al. (2023) demuestra que la hepcidina puede tener un efecto positivo en la restauración de la flora intestinal después de infecciones, es crucial considerar que un desbalance prolongado en la regulación de la hepcidina puede afectar negativamente la microbiota intestinal. Esta hormona tiene el potencial de alterar la composición de la microbiota al modificar la disponibilidad de hierro, un elemento esencial para muchas bacterias. Por ello, consideramos que en la flora intestinal, un exceso de hepcidina podría reducir la disponibilidad de hierro a niveles que afectan no solo a los patógenos sino también a las bacterias comensales beneficiosas, lo que podría llevar a un desbalance microbiológico. Por lo tanto, la administración exógena de hepcidina, si no se regula adecuadamente, podría comprometer la capacidad del pez para transportar oxígeno y afectar la microbiota intestinal, lo que genera la necesidad de desarrollar un enfoque equilibrado entre su regulación y el uso terapéutico.

En otro estudio reciente realizado por Wang et al. (2022) encontraron que la suplementación de la dieta con 400mg/kg de peso de AMP en la carpa cruciana del Pengze (*Carassius auratus* var. Pengze) mejoró la función de enzimas antioxidantes y las enzimas digestivas intestinales, la resistencia antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* y reguló la composición de la microbiota intestinal del pez.

En nuestro trabajo de doctorado se logró obtener subfracciones de *Scopulariopsis brevicaulis* activas que en el análisis del contenido de sus moléculas se encontraron

derivados de ácido cólico y dipéptidos aún no identificados a nivel de su estructura. El nuevo desafío es lograr obtener cantidades suficientes de estas moléculas para su identificación estructural completa con el fin de confirmar el interés de los dipéptidos por su novedad y para la confirmación de sus actividades antimicrobianas sobre la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila*.

VII. CONCLUSIONES

- La cepa HGU11_4 de la especie *Scopulariopsis brevicaulis* presentó actividad antagónica contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila*, con un Potencial Antimicrobiano de 1.5. Esta cepa fue seleccionada debido a la falta de estudios previos sobre su actividad contra *Aeromonas*.
- El extracto DCM obtenido a partir del cultivo en masa del hongo *S. brevicaulis* presentó actividad contra *Aeromonas hydrophila* obteniéndose valores de IC₅₀ y MIC de 0.3 y 0.5mg/mL respectivamente.
- A partir del extracto crudo DCM del hongo *S. brevicaulis*, se logró concentrar la actividad antimicrobiana sobre *A. hydrophila* en las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7. De estas, la subfracción 4.7 demostró mayor actividad selectiva, con un Índice de Selectividad (IS) superior a 16.
- El análisis preliminar por UPLC-HRMS de las fracciones de D y E y las subfracciones 4.5, 4.6 y 4.7 permitió la identificación de compuestos derivados del ácido cólico, las moléculas Escopularida A y B, así como la N-acetiltiramina. Además, se identificaron Escopularidas y Dipéptidos que podrían representar nuevos compuestos con potencial antimicrobiano.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por hongos levaduriformes en condiciones de un cultivo a mayor escala.
- Investigar la estabilidad y la cinética de producción de los metabolitos bioactivos del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* bajo la presencia de diferentes agentes estimulantes.
- Realizar ensayos de toxicidad y evaluaciones de seguridad de los metabolitos producidos por *Scopulariopsis brevicaulis*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelraof, M., Nooman, M. U., Hashem, A. H., & Al-Kashef, A. S. (2024). Production and optimization of surfactin produced from locally isolated *Bacillus halotolerans* grown on agro-industrial wastes and its antimicrobial efficiency. *BMC microbiology*, 24(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03338-w>
2. Acuña-Fontecilla, A., Silva-Moreno, E., Ganga, MA., & Godoy, L. (2017). Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CyTA-Journal of food*, 15(3), 457-465. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1297961>.
3. Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2017). Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in pharmacology*, 8, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828>.
4. Akter, N., Hashim, R., Pham, H. Q., Choi, S. D., Lee, D. W., Shin, J. H., & Rajagopal, K. (2020). *Lactobacillus acidophilus* Antimicrobial Peptide Is Antagonistic to *Aeromonas hydrophila*. *Frontiers in microbiology*, 11, 570851. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.570851>.
5. Ahmadi Badi, S., Bereimipour, A., Rohani, P., Khatami, S., & Siadat, S. D. (2024). Interplay between gut microbiota and the master iron regulator, hepcidin, in the pathogenesis of liver fibrosis. *Pathogens and disease*, 82, ftae005. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftae005>.
6. Alvarez, D., Wilkinson, K. A., Treilhou, M., Téné, N., Castillo, D., & Sauvain, M. (2019). Prospecting Peptides Isolated From Black Soldier Fly

- (Diptera: Stratiomyidae) With Antimicrobial Activity Against *Helicobacter pylori* (Campylobacterales: Helicobacteraceae). *Journal of insect science* (Online), 19(6), 17. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez120>.
7. Amat-García, E. C., Amat-García, G. D., & Henaom, L. G. (2004). Diversidad taxonómica y ecológica de la entomofauna micófaga en un bosque altoandino de la cordillera oriental de Colombia. *Ecología*, 28, 223-231
 8. Andrewes, P., Cullen, W. R., Feldmann, J., Koch, I., Polishchuk, E. & Reimer, K. J. (1998), The production of methylated organoantimony compounds by *Scopulariopsis brevicaulis*. *Applied Organometallic Chemistry*, 12, 827-842.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199812\)12:12<827::AID-AOC797>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199812)12:12<827::AID-AOC797>3.0.CO;2-O).
 9. Andrzejewska, E., & Szkaradkiewicz, A. (2007). Antagonistyczne oddziaływanie *Lactobacillus acidophilus* wobec klinicznych szczepów *Helicobacter pylori* [Evaluation of the antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus* on clinical strains of *Helicobacter pylori*]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 59(1), 59–64.
 10. Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*, 53(8), 645-656.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201200187>.

11. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
12. Barale, S. S., Ghane, S. G. & Sonawane, K. D. (2022). Purification and characterization of antibacterial surfactin isoforms produced by *Bacillus velezensis* SK. *AMB Express*, 12, 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01348-3>.
13. Basu, M., Paichha, M., Swain, B., Lenka, S. S., Singh, S., Chakrabarti, R., & Samanta, M. (2015). Modulation of TLR2, TLR4, TLR5, NOD1 and NOD2 receptor gene expressions and their downstream signaling molecules following thermal stress in the Indian major carp catla (*Catla catla*). *Biotech*, 5(6), 1021–1030. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0306-5>.
14. Buchmann, K. (2022). Control of parasitic diseases in aquaculture. *Parasitology*, 1-13. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001093>.
15. Cavalero, D. A., & Cooper, D. G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of biotechnology*, 103(1), 31–41. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00067-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00067-1).
16. Chen, Y., Aorigele, C., Wang, C., Simujide, H., & Yang, S. (2015). Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from koumiss and their antibacterial effect. *Journal of food and nutrition research*, 3, 52-56. <https://doi.org/10.12691/jfnr-3-1-9>.
17. Choi, W., Yun, J., Chu, J., & Chu, K. (2012). Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram-negative

- bacteria. *Entomological research*, 42, 219-226.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2012.00465.x>.
18. Choi, W. H., Choi, H. J., Goo, T. W., & Quan, F. S. (2018). Novel antibacterial peptides induced by probiotics in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Entomological Research*, 48, 237– 247.
<https://doi.org/10.1111/1748-5967.12259>.
19. Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1218(19), 2684– 2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>.
20. Correa Vásquez, Y. D. M. (2018). Aislamiento e identificación de hongos con actividad antibiótica provenientes del tracto digestivo de larvas de *Hermetia illucens* (orden: Diptera).
21. Correa, Y., Cabanillas, B., Jullian, V., Álvarez, D., Castillo, D., Dufloer, C., Bustamante, B., Roncal, E., Neyra, E., Sheen, P., & Sauvain, M. (2019). Identification and characterization of compounds from *Chrysosporium multifidum*, a fungus with moderate antimicrobial activity isolated from *Hermetia illucens* gut microbiota. *PloS one*, 14(12), e0218837.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218837>.
22. Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Buitrago, M. J., Monzón, A., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2003). *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrobial agents of chemotherapy*, 47(7), 2339-2341.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2339-2341.2003>.

23. De Mandal, S., Panda, A. K., Murugan, C., Xu, X., Senthil Kumar, N., & Jin, F. (2021). Antimicrobial Peptides: Novel Source and Biological Function With a Special Focus on Entomopathogenic Nematode/Bacterium Symbiotic Complex. *Frontiers in microbiology*, *12*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.555022>.
24. De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., & Van Campenhout, L. (2018). Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and environmental microbiology*, *84*(9), e02722-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>.
25. Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *The AAPS journal*, *17*(3), 513-524. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>.
26. Driche, E. H., Badji, B., Bijani, C., Belghit, S., Pont, F., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2022). A New Saharan Strain of *Streptomyces* sp. GSB-11 Produces Maculosin and N-acetyltyramine Active Against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *Current microbiology*, *79*(10), 298. <https://dx.doi.org/10.1007/s00284-022-02994-3>.
27. Elbanna, A. H., Khalil, Z. G., Bernhardt, P. V., & Capon, R. J. (2019). Scopularides revisited: Molecular networking guided exploration of lipodepsipeptides in Australian marine fish gastrointestinal tract-derived fungi. *Marine drugs*, *17*(8), 475. <https://doi.org/10.3390/md17080475>.

28. Ellis A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and comparative immunology*, 25(8-9), 827–839. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00038-6).
29. Erickson, M. C., Islam, M., Sheppard, C., Liao, J., & Doyle, M. P. (2004). 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*, 67(4), 685–690. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.4.685>.
30. Feria, M., Castañeda, A., Toledo, O., Castillo, D., Cueva, M., & Cedeño, V. (2019). Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 30(2), 908-922. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.15407>.
31. Frías-Salcedo, J. A. (2017). El género *Aeromonas* como patógeno humano. *Revista de sanidad militar*, 58(4), 321-323.
32. Gieseke, C. M., Mayer, T. D., Crosby, T. C., Carson, J., Dalsgaard, I., Darwish, A. M., Gaunt, P. S., Gao, D. X., Hsu, H. M., Lin, T.L., Oaks, J. L., Pyecroft, M., Teitzel, C., Somsiri, T., & Wu, C. C. (2012). Quality control ranges for testing broth microdilution susceptibility of *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum* to nine antimicrobials. *Diseases of aquatic organisms*, 101(3), 207-215. <https://doi.org/10.3354/dao02527>.

33. Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., & Scherer, S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 313–318. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.313-318.2006>.
34. Gonçalves Pessoa, R. B., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., Dos Santos Correia, M. T., de Carvalho, E. V. M. M., Coelho, L. C. B. B. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial pathogenesis*, 130, 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>.
35. Han, J. E., Kim, J. H., Choresca, C., Shin, S. P., Jun, J. W., & Park, S. C. (2013). Draft genome sequence of a clinical isolate, *Aeromonas hydrophila* SNUFPC-A8, from a moribund cherry salmon (*Oncorhynchus masou masou*). *Genome Announcements*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00133-12>.
36. Harlystiarini, H., Mutia, R., Wibawan, I. W. T., & Astuti, D. A. (2019). *In Vitro* Antibacterial Activity of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larva Extracts Against Gram-Negative Bacteria. *Buletin Peternakan*, 43(2), 125-129. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v43i2.42833>.
37. Hayashi, A., Aoyagi, H., Yoshimura, T., & Tanaka, H. (2007). Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(4), 358-367. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.358>.

38. Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2019). The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms*, 7(3), 91.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7030091>.
39. Horng, Y. B., Yu, Y. H., Dybus, A., Hsiao, F. S., & Cheng, Y. H. (2019). Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB express*, 9(1), 188.
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0914-2>.
40. Hussain, I. A., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Raj, K. T., & Jeevithan, E. (2014). Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* along with other *Aeromonas* spp. from fish and fishery products by multiplex PCR. *Journal of food science and technology*, 51(2), 401-407.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1190-9>.
41. Huyben, D., Vidakovic, A., Hallgren, S. H., & Langeland, M. (2019). High-throughput sequencing of gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed larval and pre-pupae stages of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Aquaculture*, 500, 485-491.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.034>.
42. Ilić, N., Novković, M., Guida, F., Xhindoli, D., Benincasa, M., Tossi, A., & Juretić, D. (2013). Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(3), 1004–1012.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.017>

43. Iwashita, M. K., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T., & Ranzani-Paiva, M. J. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 43(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.008>.
44. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.
45. Jay A. Yoder, Joshua B. Benoit & Lawrence W. Zettler (2003) Effects of salt and temperature on the growth rate of a tick-associated fungus, *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier (Deuteromycota). *International Journal of Acarology*, 29(3), 265-269. <https://doi.org/10.1080/01647950308684338>.
46. Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S. B., Choi, Y., & Lee, S. J. (2011). The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Current microbiology*, 62(5), 1390–1399. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9874-8>.
47. Jiang, J., Gao, L., Bie, X., Lu, Z., Liu, H., Zhang, C., Lu, F., & Zhao, H. (2016). Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC microbiology*, 16, 31. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0645-3>.
48. John, M. B., Chandran, M. R., Aruna, B. V., & Anbarasu, K. (2002). Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major

- carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 12(3), 201–207. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0365>.
49. Jorgensen, J. H., & Hindler, J. F. (2007). New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(2), 280–286. . <https://doi.org/10.1086/510431>.
50. Jubirt, M. M., Hanson, L. A., Hanson-Dorr, K. C., Ford, L., Lemmons, S., Fioranelli, P., & Cunningham, F. L. (2015). Potential for great egrets (*Ardea alba*) to transmit a virulent strain of *Aeromonas hydrophila* among channel catfish (*Ictalurus punctatus*) culture ponds. *Journal of wildlife diseases*, 51(3), 634–639. <https://doi.org/10.7589/2014-06-156>.
51. Kim, K.M., Lee, J.Y., Kim, C.K. et al. (2009). Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of pharmacal research*, 32(5), 711–715. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1509-2>.
52. Kumar, S., Raman, R. P., Pandey, P. K., Mohanty, S., Kumar, A., & Kumar, K. (2013). Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.038>.
53. Lalander, C., Diener, S., Magri, M. E., Zurbrügg, C., Lindström, A., & Vinnerås, B. (2013). Faecal sludge management with the larvae of the black

soldier fly (*Hermetia illucens*) from a hygiene aspect. *The Science of the total environment*, 458-460, 312–318.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>.

54. Li, X., Jaafar, R., He, Y., Wu, B., Kania, P., & Buchmann, K. (2022). Effects of a *Pseudomonas* H6 surfactant on rainbow trout and *Ichthyophthirius multifiliis*: *In vivo* exposure. *Aquaculture*, 547, 737479. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737479>.
55. Lilge, L., Ersig, N., Hubel, P., Aschern, M., Pillai, E., Klausmann, P., Pfannstiel, J., Henkel, M., Morabbi Heravi, K., & Hausmann, R. (2022). Surfactin Shows Relatively Low Antimicrobial Activity against *Bacillus subtilis* and Other Bacterial Model Organisms in the Absence of Synergistic Metabolites. *Microorganisms*, 10(4), 779. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040779>.
56. Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., Oh, S., & Gay, C. G. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary research*, 49(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>.
57. Lim, S. L., & Tay S. T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical biomedicine*, 28(2):438-443.
58. Liu, C., Wang, C., & Yao, H. (2019). Comprehensive Resource Utilization of Waste Using the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae). *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(6), 349. <https://doi.org/10.3390/ani9060349>.

59. Long, J., Chen, Y., Chen, W., Wang, J., Zhou, X., Yang, B., & Liu, Y. (2021). Cyclic Peptides from the Soft Coral-Derived Fungus *Aspergillus sclerotiorum* SCSIO 41031. *Marine drugs*, 19(12), 701. <https://doi.org/10.3390/md19120701>.
60. Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation--a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*, 12(2), 1043–1065. <https://doi.org/10.3390/md12021043>.
61. Mashoof, S., & Criscitiello, M. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology*, 5(4), 45. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>.
62. Mateo, E. C., Castro, T., Sierralta, V., & Mateo, D. R. (2017). Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. *Journal of fish diseases*, 40(7), 941–946. <https://doi.org/10.1111/jfd.12555>.
63. Miller, R. A., Walker, R. D., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., Gieseke, C., Hsu, H. M., Mathers, J. J., Papapetropoulou, M., Petty, B., Teitzel, C., & Reimschuessel, R. (2005). Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Diseases of aquatic organisms*, 64(3), 211–222. <https://doi.org/10.3354/dao064211>.
64. Mudau, M. M., & Setati, M. E. (2006). Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments. *Current microbiology*, 52(6), 477–481. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0439-6>.

65. Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., Mahmood, M. S., Siddique, A. B., & Iqbal, M. (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*, 265. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-265>.
66. Ndjakou Lenta, B., Vonthron-Sénécheau, C., Fongang Soh, R., Tantangmo, F., Ngouela, S., Kaiser, M., Tsamo, E., Anton, R., & Weniger, B. (2007). In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, *111*(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.036>.
67. Okazaki, F., Zang, L., Nakayama, H., Chen, Z., Gao, Z. J., Chiba, H., Hui, S. P., Aoki, T., Nishimura, N., & Shimada, Y. (2019). Microbiome Alteration in Type 2 Diabetes Mellitus Model of Zebrafish. *Scientific reports*, *9*(1), 867. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37242-x>.
68. Oliveira, S. T. L. de, Veneroni-Gouveia, G., Santurio, J. M., & Costa, M. M. da. (2013). *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after the intake of aflatoxins. *Arquivos Do Instituto Biológico*, *80*(4), 400–406.
69. Pan, H., Li, H., Wu, S., Lai, C., & Guo, D. (2023). De novo biosynthesis of N-acetyltyramine in engineered *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, *162*, 110149. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110149>.

70. Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Microbiology of waterborne diseases. (second ed.), Elsevier. Pp. 49-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00003-2>.
71. Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., & Almeida-Aguiar, C. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological research*, 168(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.008>.
72. Perretta, A., Antúnez, K., & Zunino, P. (2019). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 4-8. <https://doi.org/10.29155/vet.55.211.1>.
73. Pluskal, T., Uehara, T., & Yanagida, M. (2012). Highly accurate chemical formula prediction tool utilizing high-resolution mass spectra, MS/MS fragmentation, heuristic rules, and isotope pattern matching. *Analytical chemistry*, 84(10), 4396–4403. <https://doi.org/10.1021/ac3000418>.
74. Polak-Berecka, M., Waśko, A., & Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales Umcs, Biologia*, 64, 15–24. <https://doi.org/10.2478/v10067-010-0002-0>.
75. Qin, C., Sun, J., He, Y., Wang, J., Han, Y., Li, H., & Liao, X. (2019). Diurnal rhythm and pathogens induced expression of toll-like receptor 9 (TLR9) in *Pelteobagrus vachellii*. *Fish & shellfish immunology*, 87, 879–885. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.038>.

76. Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., & Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical analysis*, 2(5), 199-203. <https://doi.org/10.1002/pca.2800020503>.
77. Ran, C., Huang, L., Hu, J., Tacon, P., He, S., Li, Z., Wang, Y., Liu, Z., Xu, L., Yang, Y., & Zhou, Z. (2016). Effects of dietary live and heat-inactive baker's yeast on growth, gut health, and disease resistance of Nile tilapia under high rearing density. *Fish & shellfish immunology*, 56, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.001>.
78. Reina, J. C., Pérez-Victoria, I., Martín, J., & Llamas, I. (2019). A Quorum-Sensing Inhibitor Strain of *Vibrio alginolyticus* Blocks Qs-Controlled Phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine drugs*, 17(9), 494. <https://doi.org/10.3390/md17090494>.
79. Reis Dias, M. K., Oba Yoshioka, E. T., Ruiz Rodriguez, A. F., Ribeiro, R. A., Escócio Drummond Viana Faria, F. S., Almeida Ozório, R. O., & Tavares-Dias, M. (2019). Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets. *Fish & shellfish immunology*, 84, 843–847. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.045>.
80. Ren, Y., Li, Y., Han, G., Zhu, F., Liu, C., & Song, J. (2019). *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 35(5), 759–765. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.180399>.

81. Robertson, B. K., Harden, C., Selvaraju, S. B., Pradhan, S., & Yadav, J. S. (2014). Molecular Detection, Quantification, and Toxigenicity Profiling of *Aeromonas* spp. in Source- and Drinking-Water. *The open microbiology journal*, 8, 32–39. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010032>.
82. Roh, S. W., Nam, Y. D., Chang, H. W., Kim, K. H., Kim, M. S., Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, W. J., & Bae, J. W. (2008). Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*, 74(20), 6171–6177. <https://doi.org/10.1128/AEM.00301-08>.
83. Romstad, A. B., Reitan, L. J., Midtlyng, P., Gravningen, K., Emilsen, V., & Evensen, Ø. (2014). Comparison of a serological potency assay for furunculosis vaccines (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) to intraperitoneal challenge in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 42(2), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.007>.
84. Roth, N., Hofacre, C., Zitz, U., Mathis, G. F., Moder, K., Doupovec, B., Berghouse, R., & Domig, K. J. (2019). Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in broilers challenged with a multi-resistant *E. coli* strain and received ampicillin, an organic acid-based feed additive or a synbiotic preparation. *Poultry science*, 98(6), 2598–2607. <https://doi.org/10.3382/ps/pez004>.
85. Samuel, L., Marian, M. M., Apun, K., Lesley, M. B., & Son, R. (2011). Characterization of *Escherichia coli* isolated from cultured catfish by antibiotic resistance and RAPD analysis. *International food research journal*, 18(3), 971–976.

86. Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., Cano-Lira, J., Gené, J., Decock, C. A., de Hoog, G. S., & Guarro, J. (2013). *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *Journal of clinical microbiology*, *51*(12), 3937–3943. <https://doi.org/10.1128/JCM.01927-13>.
87. Savage, P. B., & Li, C. (2000). Cholic acid derivatives: novel antimicrobials. *Expert opinion on investigational drugs*, *9*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.2.263>.
88. Serrano-Martínez, E., Verónica, C. P., Marco, Q. H., Gina, C. V., & Jorge, L. Q. (2014). Isolation of bacteria and fungi in tissues of paiche (*Arapaima gigas*) reared in captivity. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, *25*(1), 117–122.
89. Setiaji, J., Feliatra, F., Setiaji, J., Teruna, H. Y., Lukistyowati, I., Suharman, I., Muchlisin, Z. A., & Johan, T. I. (2020). Antibacterial activity in secondary metabolite extracts of heterotrophic bacteria against *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*, *9*, 1491. <https://doi.org/10.12688/f1000research.26215.1>.
90. Shah, V., Badia, D., & Ratsep, P. (2007). Sophorolipids having enhanced antibacterial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(1):397-400. <https://doi.org/10.1128/AAC.01118-06>.
91. Sharma, D., Singh, S. S., Baidara, P., Sharma, S., Khatri, N., Grover, V., Patil, P. B., & Korpole, S. (2020). Surfactin like broad spectrum antimicrobial lipopeptide co-produced with sublancin from *Bacillus subtilis*

- strain A52: dual reservoir of bioactives. *Frontiers microbiology*, *11*, 1167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01167>.
92. Singab, A. N. B., Elkhawas, Y. A., Al-Sayed, E., Elissawy, A. M., Fawzy, I. M., & Mostafa, N. M. (2023). Antimicrobial activities of metabolites isolated from endophytic *Aspergillus flavus* of *Sarcophyton ehrenbergi* supported by in-silico study and NMR spectroscopy. *Fungal biology and biotechnology*, *10*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00161-2>.
93. Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., & Andraso, G. (2014). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant aeromonas isolates from Lake Erie. *Applied and environmental microbiology*, *80*(3), 841–848. <https://doi.org/10.1128/AEM.03645-13>.
94. Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in immunology*, *10*, 2292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>.
95. Stratev, D., & Odeyemi, O. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of infection and public health*, *9*(5), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>.
96. Subbaram, K., Gatasheh, M. K., Al Azzam, K. M., & Kannan, H. (2019). Molecular identification of diarrheal *Aeromonas* using immuno magnetic polymerase chain reaction (IM-PCR) technique: a comparative study with

- conventional culture method. *African health sciences*, 19(2), 2036–2042.
<https://doi.org/10.4314/ahs.v19i2.27>.
97. Suh, S.O., Marshall, C. J., Mchugh, J. V., & Blackwell, M. (2003). Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular ecology*, 12(11), 3137-3145.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01973.x>.
98. Suh, S. O., McHugh, J. V., Pollock, D. D., & Blackwell, M. (2005). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological research*, 109(Pt 3), 261–265. <https://doi.org/10.1017/s0953756205002388>.
99. Suleimana, M. M., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2009). Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 7(1), 64–78. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v7i1.57269>.
100. Tamminen, A., Kramer, A., Labes, A., & Wiebe, M. G. (2014). Production of scopularide A in submerged culture with *Scopulariopsis brevicaulis*. *Microbial cell factories*, 13, 89. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-89>.
101. Valderrama, K., Soto-Dávila, M., Segovia, C., Vásquez, I., Dang, M., & Santander, J. (2019). *Aeromonas salmonicida* infects Atlantic salmon (*Salmo salar*) erythrocytes. *Journal of fish diseases*, 42(11), 1601–1608.
<https://doi.org/10.1111/jfd.13077>.
102. van Duijkeren, E., Schwarz, C., Bouchard, D., Catry, B., Pomba, C., Baptiste, K. E., Moreno, M. A., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P.,

- Teale, C., Wester, A. L., Ignate, K., Kunsagi, Z., & Jukes, H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 74(9), 2480–2496. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>.
103. Varotto Boccazzi, I., Ottoboni, M., Martin, E., Comandatore, F., Vallone, L., Spranghers, T., Eeckhout, M., Mereghetti, V., Pinotti, L., & Epis, S. (2017). A survey of the mycobiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *PloS one*, 12(8), e0182533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182533>.
104. Vega FE, Blackwell M. (2005). *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*: Oxford University Press.
105. Vogel, H., Müller, A., Heckel, D. G., Gutzeit, H., & Vilcinskis, A. (2018). Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & comparative immunology*, 78, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>.
106. Waill A. E., & Ghoson M. D. (2022) *Botryotrichum* and *Scopulariopsis* Secondary Metabolites and Biological Activities. *Journal biotechnology and bioprocessing*, 3(1). <https://doi.org/10.31579/2766-2314/067>.
107. Wakefield, J., Hassan, H. M., Jaspars, M., Ebel, R., & Rateb, M. E. (2017). Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 8, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01284>.

108. Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kaponov, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
109. Wang, S., Liu, S., Wang, C., Ye, B., Lv, L., Ye, Q., Xie, S., Hu, G., & Zou, J. (2022). Dietary Antimicrobial Peptides Improve Intestinal Function, Microbial Composition and Oxidative Stress Induced by *Aeromonas hydrophila* in Pengze Crucian Carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Antioxidants*, 11(9), 1756. <https://doi.org/10.3390/antiox11091756>.
110. Wang, Y. S., & Shelomi, M. (2017). Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(10), 91. <https://doi.org/10.3390/foods6100091>.
111. Wiese, J., Ohlendorf, B., Blümel, M., Schmaljohann, R., & Imhoff, J. F. (2011). Phylogenetic identification of fungi isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Marine drugs*, 9(4), 561–585. <https://doi.org/10.3390/md9040561>.
112. Wynants, E., Frooninckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrock, C., Wohlfahrt, J., Van Schelt, J., Depraetere, S., Lievens, B., Van Miert, S., Claes, J., & Van Campenhout, L. (2019). Assessing the

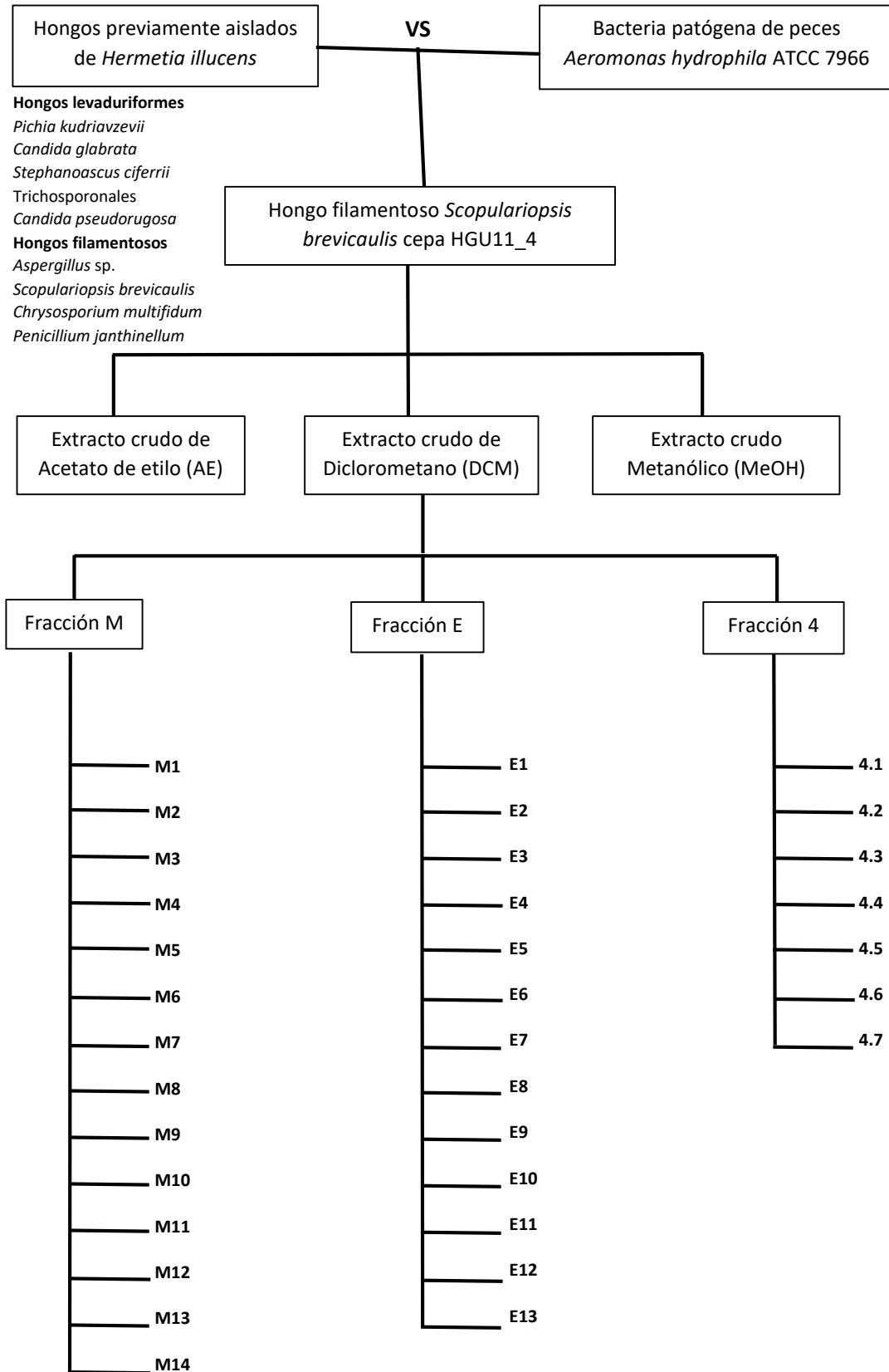
- Microbiota of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) Reared on Organic Waste Streams on Four Different Locations at Laboratory and Large Scale. *Microbial ecology*, 77(4), 913–930. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1286-x>.
113. Wu, J., Yu, T. T., Kuppusamy, R., Hassan, M. M., Alghalayini, A., Cranfield, C. G., Willcox, M. D. P., Black, D. S., & Kumar, N. (2022). Cholic Acid-Based Antimicrobial Peptide Mimics as Antibacterial Agents. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4623. <https://doi.org/10.3390/ijms23094623>.
114. Wu, R., Shen, J., Tian, D., Yu, J., He, T., Yi, J., & Li, Y. (2020). A potential alternative to traditional antibiotics in aquaculture: Yeast glycoprotein exhibits antimicrobial effect *in vivo* and *in vitro* on *Aeromonas caviae* isolated from *Carassius auratus gibelio*. *Veterinary medicine and science*, 6(3), 639–648. <https://doi.org/10.1002/vms3.253>.
115. Yao, L., Wan, Z., Li, R., & Yu, J. (2015). *In Vitro* Triple Combination of Antifungal Drugs against Clinical *Scopulariopsis* and *Microascus* Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 5040–5043. <https://doi.org/10.1128/AAC.00145-15>.
116. Yao, Z., Li, W., Lin, Y., Wu, Q., Yu, F., Lin, W., & Lin, X. (2016). Proteomic Analysis Reveals That Metabolic Flows Affect the Susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to Antibiotics. *Scientific reports*, 6, 39413. <https://doi.org/10.1038/srep39413>.
117. Yu, Z., Lang, G., Kajahn, I., Schmaljohann, R., & Imhoff, J. F. (2008). Scopularides A and B, Cyclodepsipeptides from a Marine Sponge-Derived

- Fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. *Journal of natural products*, 71(6), 1052–1054. <https://doi.org/10.1021/np070580e>.
118. Zeineldin, M., Megahed, A., Burton, B., Blair, B., Aldridge, B., & Lowe, J. F. (2019). Effect of Single Dose of Antimicrobial Administration at Birth on Fecal Microbiota Development and Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in Piglets. *Frontiers in microbiology*, 10, 1414. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01414>.
119. Zepeda-Velázquez, A. P. (2015). *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *AquaTIC*, 42, 1-16.
Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49444322001>.
120. Zhang, D., Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2014). Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. *Fish & shellfish immunology*, 36(1), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.11.015>.
121. Zhao, B. R., Zheng, Y., Gao, J., & Wang, X. W. (2020). Maturation of an Antimicrobial Peptide Inhibits *Aeromonas hydrophila* Infection in Crayfish. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 204(3), 487–497. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900688>.
122. Zhao, X. L., Jin, Z. H., DI, G. L., Li, L., & Kong, X. H. (2019). Molecular characteristics, pathogenicity and medication regimen of *Aeromonas hydrophila* isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *The Journal of veterinary medical science*, 81(12), 1769–1775. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0025>.

123. Zhou, Y., Yu, L., Nan, Z., Zhang, P., Kan, B., Yan, D., & Su, J. (2019). Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3766-0>.
124. Zhu, Q. Y., Chen, R. Y., Yu, J., Ding, G. H., Seah, R. W. X., & Chen, J. (2023). Antimicrobial peptide hepcidin contributes to restoration of the intestinal flora after *Aeromonas hydrophila* infection in *Acrossocheilus fasciatus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, *263*, 109486. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109486>.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Esquema de trabajo



ANEXO 2: Lista de hongos levaduriformes cultivados

Espece	Código de la cepa fúngica
<i>Pichia kudriavzevii</i>	HGS11_1; HGS11_2; HGS11_5; HGS11_6; HGS11_7; HGS11_8; HGS11_ 12; HGS11_14
<i>Candida glabrata</i>	HGS11_3; HGS11_4; HGS11_9; HGS11_13
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	HGM11_6
Trichosporonales no clasificados	HGM11_9; HGM11_10; HGM11_11
<i>Candida pseudorugosa</i>	HGM11_13

ANEXO 3: Lista de hongos filamentosos cultivados

Especie	Códigos de las cepas fúngicas
<i>Aspergillus sp.</i>	HGU11_2; HGU11_3; HGU11-11
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	HGU11_4; HGU11_5; HGU11_6; HGU11_7
<i>Chrysosporium multifidum</i>	HGU11_8
<i>Penicillium janthinellum</i>	HGU11_10

ANEXO 4a: Diagrama de producción de extractos crudos AE, DCM y MeOH a partir de los hongos *Aspergillus* sp., *S. brevicaulis* y *C. multifidum*.



ANEXO 4b: Peso de los extractos obtenidos a partir de los hongos filamentosos *Aspergillus* sp., *S. brevicaulis* y *C. multifidum*

Cepa fúngica	Extracto	Producción (mg)
<i>Aspergillus</i> sp. (HGU11_3)	AE	92.1
	DCM	36.1
	MeOH	276.2
<i>S. brevicaulis</i> (HGU11_4)	AE	55.0
	DCM	30.5
	MeOH	444.0
<i>C. multifidum</i> (HGU11_8)	AE	111.6
	DCM	93.3
	MeOH	1276.9

Dónde: AE: Extracto de acetato de etilo; DCM: Extracto de diclorometano; MeOH: Extracto de metanol.

ANEXO 5: Fraccionamiento del extracto DCM y evaluación de su actividad biológica sobre la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966 mediante el método de bioautografía por punto

Fracciones	Masa muestra (mg)	Diámetro de halo (mm)	Claridad del halo
M	329.0	5.3 ± 0.3	+
A	740.3	0	-
B	41.3	0	-
C	12.5	0	-
D	11.7	8.3 ± 0.5	++
E	52.9	8.7 ± 0.4	++
F	13.7	4.0 ± 0.2	-
G	21.6	0	-
H	35.3	0	-
I	5.6	NE	NE
J	17.2	NE	NE

Dónde: (+) indica la claridad baja del halo, (++) indica la claridad media del halo, (+++) indica la claridad alta del halo en relación a la Tetraciclina (+++), NE: No evaluado.

ANEXO 6: Resultados de actividad biológica de 14 subfracciones de la fracción M sobre la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966 mediante el método de bioautografía por punto.

Subfracciones	Masa muestra (mg)	Diámetro de halo (mm)	Claridad del halo
M1	1.1	ND	ND
M2	23.5	0	-
M3	70.6	0	-
M4	20.0	3 ± 0.4	+
M5	37.6	0	-
M6	16.2	0	-
M7	1.9	ND	ND
M8	29.1	3 ± 0.5	+
M9	27.0	6 ± 0.4	++
M10	7.0	0	-
M11	20.6	0	-

M12	11.9	0	-
M13	3.9	ND	ND
M14	5.8	0	-
Tetraciclina	-	14.8 ± 1.5	+++

Dónde: (+) indica la claridad baja del halo, (++) indica la claridad media del halo, (+++) indica la claridad alta del halo en relación a la Tetraciclina (+++), ND: No determinado por tener poca cantidad (mg) de la subfracción.

ANEXO 7: Resultados de actividad biológica de 13 subfracciones de la fracción E sobre la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966 mediante el método de bioautografía por punto

Subfracciones	Masa muestra (mg)	Diámetro de halo (mm)	Claridad del halo
E1	0.8	4.8 ± 0.5	+
E2	2.9	7.5 ± 0.9	+
E3	2.9	0	-
E4	5.8	3.8 ± 0.5	+
E5	0.9	0	-
E6	0.8	0	-
E7	2.5	14.2 ± 1.5	++
E8	2.8	0	-
E9	1.1	0	-
E10	1.6	0	-
E11	1.9	0	-
E12	3.8	0	-
E13	7.5	0	-
Tetraciclina	-	18.3 ± 1.6	+++

Dónde: (+) indica la claridad baja del halo, (++) indica la claridad media del halo, (+++) indica la claridad alta del halo en relación a la Tetraciclina (+++), ND: No determinado por tener poca cantidad (mg) de la subfracción.

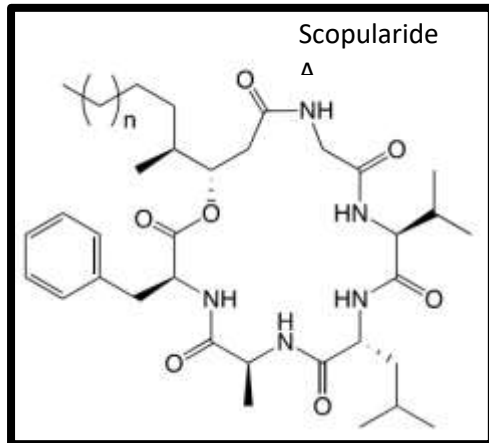
ANEXO 8: Resultados de actividad biológica de 9 fracciones del extracto DCM sobre la bacteria *A. hydrophila* ATCC 7966 mediante el método de bioautografía por punto

Subfracciones	Masa muestra (mg)	Diámetro de halo (mm)	Claridad del halo
1	7.5	6.8 ± 0.8	+
2	1.5	ND	
3	181.0	7.5 ± 0.5	+
4	160.3	12.3 ± 1.4	++
5	13.8	16.3 ± 1.2	+++
6	23.0	11.3 ± 0.9	++
7	2.4	ND	+
8	4.3	9.0 ± 1.1	+
9	94.3	7.7 ± 0.5	+
Tetraciclina	-	19.1 ± 1.5	+++

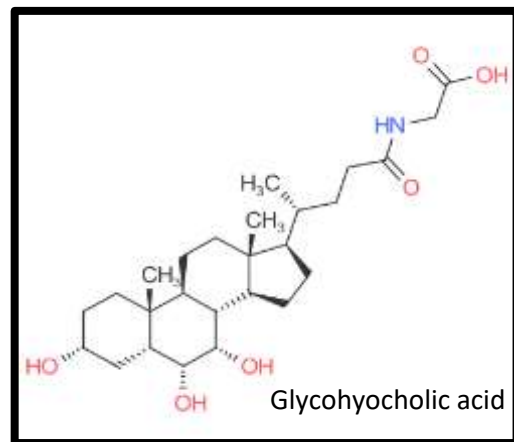
Dónde: (+) indica la claridad baja del halo, (++) indica la claridad media del halo, (++++) indica la claridad alta del halo en relación a la Tetraciclina (+++), ND: No determinado por tener poca cantidad (mg) de la subfracción.

ANEXO 9: Moléculas identificadas en las fracciones Diclorometano del hongo *Scopulariopsis brevicaulis* activos contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila*.

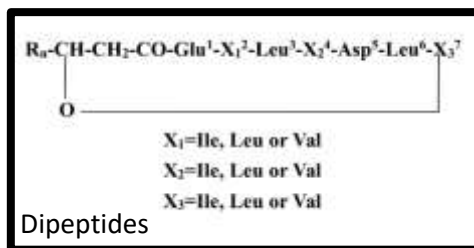
A



B



C



D

