



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSTGRADO

**BÚSQUEDA DE ANTIBIÓTICOS A  
PARTIR DE MICROORGANISMOS  
DEL TRACTO DIGESTIVO DE LA  
MOSCA SAPRÓFAGA *HERMETIA  
ILLUCENS***

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

ROMINA GERALDINE PACHECO TAPIA

**LIMA – PERÚ**

**2018**



## **ASESOR**

Dr. Michel Sauvain – Instituto de Investigación para el desarrollo (IRD-Francia)

## **MIEMBROS DEL JURADO**

Dra. Patricia Herrera

**PRESIDENTA**

MSc. Dora Maurtua

**SECRETARIA**

Dra. Dionicia Gamboa

**VOCAL**

## **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a mis padres quienes siempre han sido un ejemplo. A mis profesores y compañeros de la maestría, por compartir y enriquecer cada logro, cada tropiezo, cada conocimiento. A mis amigos por siempre haberme mostrado su apoyo y comprensión.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC) por el fondo brindado para la realización de este trabajo a través de la beca de Maestría en el programa de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Al Laboratorio Mixto Internacional LMI-LAVI (UPCH-IRD), especialmente al Dr. Michel Sauvain y a Denis Castillo. Agradezco también a todos mis compañeros y amigos de laboratorio por todo el apoyo brindado durante y después de la realización de este trabajo.

## FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto se realizó en el marco de financiamiento del Programa de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular con Convenio de Gestión N°031-2015-FONDECYT y con el proyecto de investigación “Búsqueda de nuevas moléculas antibióticas aisladas de la diversidad microbiana del tracto digestivo de una mosca peruana saprófaga” con Contrato 108-2015- FONDECYT.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</b>	6
2.1	Planteamiento del Problema	6
2.2	Marco Teórico	8
2.3	Justificación del estudio	17
2.4	Objetivos	20
2.5	Hipótesis	20
<b>III.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	21
3.1	Materiales	21
3.2	Métodos	22
3.2.1	Crianza de larvas y mantenimiento de ciclo biológico de <i>Hermetia illucens</i>	22
3.2.2	Extracción del tracto intestinal de larvas de <i>Hermetia illucens</i>	24
3.2.3	Aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal	24
3.2.4	Caracterización enzimática de las bacterias aisladas	25
3.2.5	Criopreservación y reconstitución de cepas aisladas	29
3.2.6	Extracción de ADN y amplificación del ARN ribosomal 16S	29
3.2.7	Secuenciamiento y análisis del gen del ARN ribosomal 16S bacteriano	36
3.2.8	Ensayos de enfrentamiento entra cepas aisladas y bacterias patógenas ATCC	37
3.2.9	Aislamiento biodirigido de compuestos extraídos de cultivo líquido de cepa aislada activa contra las cepas patógenas ATCC	38
3.2.10	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos	44

3.2.11 Determinación de las moléculas bioactivas por espectrometría de masas.	47
---	----

<b>IV. RESULTADOS</b>	49
-----------------------	----

4.1 Aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal de la larva de <i>Hermetia Illucens</i>	49
--	----

4.2 Identificación molecular y caracterización enzimática de las cepas aisladas de tracto intestinal de la larva de <i>Hermetia Illucens</i>	50
--	----

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas contra las cepas patógnas ATCC	53
--	----

4.4 Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del aislamiento biodirigido contra las cepas patógenas ATCC	54
--	----

4.5 Detección y caracterización de metabolitos secundarios mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	68
--	----

<b>V. DISCUSIÓN</b>	71
---------------------	----

<b>VI. CONCLUSIONES</b>	82
-------------------------	----

<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	82
-----------------------------	----

<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83
---	----

**ANEXOS**

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Bacterias utilizadas como control positivo para cada prueba enzimática.
- Tabla 2. Soluciones utilizadas para extracción de ADN genómico
- Tabla 3. Preparación de Buffer Tris, ácido acético y EDTA (TAE)
- Tabla 4. Condiciones empleadas en el master mix de PCR
- Tabla 5. Condiciones estandarizadas de ciclamiento para amplificación del gen ribosomal 16S
- Tabla 6. Condiciones empleadas en el master mix de PCR
- Tabla 7. Condiciones estandarizadas de ciclamiento para amplificación del gen ribosomal 16S
- Tabla 8. Secuencias de primers usadas para el secuenciamiento
- Tabla 9. (A) Extracción con Acetato de etilo, (B) Extracción con Éter de petróleo – metanol y (C) Extracción con Diclorometano – metanol
- Tabla 10. Sistema de elución para SPE 1
- Tabla 11. Sistema de elución para SPE2
- Tabla 12. Sistema de elución para columna abierta con silica gel 60
- Tabla 13. Cultivo del pool de bacterias del tracto intestinal en tres medios de cultivo diferente para aislamiento
- Tabla 14. Resultados positivos y negativos de pruebas enzimáticas
- Tabla 15. Clasificación taxonómica de las cepas aisladas de la larva
- Tabla 16. Resultados positivos y negativos de pruebas enzimáticas
- Tabla 17. Resumen de resultados de caracterización enzimática y actividad contra patógenas
- Tabla 18. Enfrentamiento de *Bacillus sp.* (BGS8\_5) contra bacterias patógenas
- Tabla 19. Porcentaje de inhibición de extractos a 2mg/mL frente a *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*
- Tabla 20. Bioautografía por punto de la fracción de acetato de etilo
- Tabla 21. Bioautografía por punto de la fracción metanólica (SPE2.1)
- Tabla 22. Bioautografía con corrida de TLC de la fracción metanólica (SPE2.1)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA por períodos de 5 años hasta el año 2012
- Figura 2. Representación gráfica del descubrimiento de antibióticos y primeros reportes de resistencia
- Figura 3. Ciclo biológico de *Hermetia illucens*
- Figura 4. Esquema general de la metodología
- Figura 5. Disección del intestino de una larva y diluciones del homogenizado del contenido intestinal en solución salina
- Figura 6. Procedimiento de inoculación de medios para pruebas las enzimáticas
- Figura 7. Esquema de la ubicación de primers empleados para la amplificación y secuenciamiento del gen ribosomal 16S
- Figura 8. Gel de agarosa al 1% con amplicones de aproximadamente 1500pb
- Figura 9. Gel de agarosa al 1% con amplicones obtenidos a diferentes condiciones
- Figura 10. Gel de agarosa al 1% con amplicones purificados de aproximadamente 1500pb
- Figura 11. Gel de agarosa al 1% con amplicones bacterianos empleando Phusion High – Fidelity DNA Polymerase
- Figura 12. Sembrado de muestras sobre la placa de TLC para bioautografía por punto
- Figura 13. Sembrado de muestra sobre la placa de TLC para bioautografía con corrida.
- Figura 14. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por el sobrenadante
- Figura 15. Inhibición del crecimiento de *E. coli* frente por el sobrenadante
- Figura 16. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por el sobrenadante
- Figura 17. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo sin estimular
- Figura 18. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado

- Figura 19. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo sin estimular
- Figura 20. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo estimulado
- Figura 21. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por los extractos del cultivo sin estimular
- Figura 22. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por los extractos del cultivo estimulado
- Figura 23. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado
- Figura 24. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo estimulado
- Figura 25. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado
- Figura 26. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por la fracción SPE1.2
- Figura 27. Inhibición del crecimiento de *E.coli* por la fracción SPE1.2
- Figura 28. Inhibición del crecimiento de *S.aureus* por la fracción SPE1.2
- Figura 29. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por las fracciones
- Figura 30. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por las fracciones
- Figura 31. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por las fracciones
- Figura 32. Espectro de masas obtenido a partir de la corrida en TLC de la fracción metanólica (SPE2.1) contra *S. aureus*
- Figura 33. Espectro de masas obtenido a partir de la corrida en TLC de la fracción metanólica (SPE2.1) contra *S. aureus*
- Figura 34. Estructura de la surfactina según la base de datos DNP con masa exacta de 1035.683138

## LISTA DE ABREVIATURAS

NCBI: National center for biotechnology information  
BLAST: Basic local alignment tool  
ATCC: American type culture collection  
PCR: Polymerase chain reaction  
SPE: Solid phase extraction  
TLC: Thin layer chromatography  
FDA: Food and drugs administration  
OECD: Organization for Economic Cooperation and Development  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ARN: Ácido ribonucleico  
dNTP: Deoxinucleótido  
IDSA: Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas  
OMS: Organización mundial de la salud  
MRSA: Meticilin-resistant Staphylococcus aureus  
BLEE: Betalactamasas de espectro extendido  
BSF: Black soldier fly  
UFC: Unidades formadoras de colonias  
MIC: Minimum inhibitory concentration  
TSA: Trypticase soy agar  
AN: Agar nutritivo  
AS: Agar sangre  
LBA: Luria-Bertani agar  
MNGA: Modified nutrient glucose medium  
BHA: Brain-heart infusion agar  
DMSO: Dimethyl sulfoxide  
HPLC: High performance liquid chromatography  
MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
TRIS: Tris – hydroxymethyl – aminomethane  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
TE: TRIS - EDTA  
TAE: (TRIS base – acetic acid - EDTA)

SDS: Sodium dodecyl sulfate

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide

RPM: Revoluciones por minuto

TI: Térmicamente inactivado

ACN: Acetonitrilo

DCM: Diclorometano

MEOH: Metanol

ACOET: Acetato de etilo

PP: Precipitación ácida

PBS: Tampón fosfato salino

DNP: Dictionary of natural products

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

METLIN: Metabolite and Tandem MS Database

LC/ESI/MS/MS: Liquid chromatography / Electrospray ionization / Mass spectrometry

RMN: Resonancia magnética nuclear

## RESUMEN

La resistencia a antibióticos es una de las razones más importantes que impulsa la búsqueda de nuevas drogas antibióticas mientras que las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos podría ser una de las principales causas de muerte a nivel mundial si no actuamos prontamente. La búsqueda de nuevos antibióticos en fuentes poco tradicionales o poco exploradas representan un fuente promisorio de moléculas con actividad antimicrobiana. *Hermetia illucens* es conocida por su gran capacidad de degradar materia orgánica y por poseer una microbiota intestinal muy diversa con capacidad de producir compuestos antimicrobianos. El aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal de la larva de *H. illucens* permitió identificar 7 de cepas del género *Bacillus* con capacidad de producir compuestos antibacterianos. La cepa seleccionada (BGS8\_7) posee 99% de identidad en el gen del ARNr 16S con la especie *Bacillus amyloliquefaciens*. La fracción metanólica obtenida a partir de los extractos del sobrenadante del cultivo de la cepa activa presentó actividad contra las 3 cepas patógenas utilizadas: *E. coli* ATCC 25922, *S. entérica* ATCC 1311 y *S. aureus* MRSA ATCC 43300. Los resultados de la espectrometría de masas de la fracción metanólica indican que contiene compuestos activos pertenecientes a la familia del lipopéptido surfactina. Este trabajo contiene información útil para futuros estudios que continúen con la búsqueda de antibióticos a partir de fuentes promisorias de la biodiversidad peruana para contribuir con el problema a nivel mundial de la resistencia antibiótica.

Palabras clave: *Hermetia illucens*, surfactina, lipopéptidos, *Bacillus amyloliquefaciens*

## ABSTRACT

Antibiotic resistance is one of the most important reasons that drives the search for new antibiotic drugs, while infections caused by antibiotic-resistant bacteria could be one of the leading causes of death worldwide if we do not act promptly. The search for new antibiotics in untraditional or little explored sources represents a promising source of molecules with antimicrobial activity. *Hermetia illucens* is known for its great capacity to degrade organic matter and for possessing a very diverse intestinal microbiota capable of producing antimicrobial compounds. The isolation and culture of bacteria from the intestinal tract of *H. illucens* larvae allowed the identification of 7 *Bacillus* strains capable of producing antibacterial compounds. The selected strain (BGS8\_7) possesses 99% of identity in the 16S rRNA gene with the species *Bacillus amyloliquefaciens*. The methanolic fraction obtained from extracts of the culture supernatant of the active strain showed activity against the 3 pathogenic strains: *E. coli* ATCC 25922, *S. entérica* ATCC 1311 y *S. aureus* MRSA ATCC 43300. The results of the mass spectrometry of the methanolic fraction indicate that it contains active compounds belonging to the family of the lipopeptide surfactin. This work contains useful information for future studies that continue with the search for antibiotics from promising sources of Peruvian biodiversity to contribute to the global problem of antibiotic resistance.

Key words: *Hermetia illucens*, surfactin, lipopeptide, *Bacillus amyloliquefacien*

## I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el número de nuevos antibióticos en el mercado ha mostrado una gran disminución, según los datos que se tienen desde 1980 hasta 2012 y sólo dos nuevas drogas sistémicas antibacterianas (Telavancin y Ceftaroline fosamil) fueron aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) durante el período del 2008 al 2012 (1).

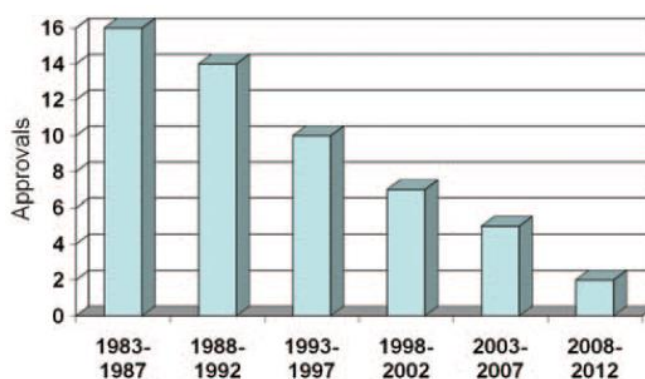


Figura 1. Nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA por períodos de 5 años hasta el año 2012 (1).

La campaña “Iniciativa 10 x ‘20”, colaboración global propuesta en el año 2010 por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA por sus siglas en inglés), tiene como objetivo apoyar el desarrollo y aprobación de 10 drogas nuevas, seguras y efectivas para el año 2020. Esta campaña al mismo tiempo promueve las soluciones legislativas, regulatorias y soluciones de financiamiento para poder hacer frente a este problema (1). Sin embargo, la situación hasta la actualidad no demuestra un gran avance con respecto a esta iniciativa.

Existen varias razones que han ocasionado la disminución del desarrollo de nuevos antibióticos. Como una de las principales, se considera que las grandes industrias farmacéuticas han redirigido sus intereses hacia aquellos medicamentos que les proveen mayor rentabilidad (2). Por ejemplo, los antibióticos son generalmente usados, según el tratamiento, por un par de semanas a diferencia de los medicamentos para enfermedades crónicas como el cáncer o enfermedades cardiovasculares, los cuales pertenecen a terapias de largo plazo, resultando así ser más rentables que las terapias de corto tiempo.

Se estima que solo media docena de compañías en los Estados Unidos y Europa mantienen los programas de investigación y desarrollo de antibióticos sin embargo, gran parte de este trabajo se continúa llevando a cabo en centros académicos y pequeñas empresas biotecnológicas (3).

La resistencia a antibióticos es una de las razones más importantes que impulsa la búsqueda de nuevas drogas antibióticas. Los microorganismos han existido desde antes de la aparición del humano en la tierra y viven en una variedad increíble de ambientes y climas debido a su gran capacidad de adaptarse, a su plasticidad genética y a su rápida replicación. El análisis de la reconstrucción genética de los genes de resistencia a varias clases de antibióticos, demuestran que existen desde mucho antes de la era antibiótica. Un ejemplo es el caso de la filogenia de las serin- y metalo-beta lactamasas, las cuales datan desde hace más de 2 mil millones de años (2) (4). Cabe mencionar que los genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos y metabolitos secundarios en bacterias se encuentran agrupados en

una línea continua en el ADN debido a la transferencia horizontal genética, por lo tanto el repertorio de metabolitos secundarios que posean dependerá principalmente, pero no únicamente, de los microorganismos que lo rodean en su ambiente natural (5).

Las enfermedades infecciosas causaron la muerte de 14 millones de personas en el año 2011 a nivel mundial y existen varios factores que contribuyen a su dispersión, como el desplazamiento de las poblaciones o el uso intensivo y constante de antibióticos, siendo este último un factor que acelera la tasa de resistencia. Actualmente, la resistencia antibiótica está presente en todos los patógenos importantes para la salud y sucede para casi todos los antibióticos, incluso dando lugar a bacterias resistentes a múltiples drogas (6).

A inicios del presente año, la OMS publicó una lista de bacterias resistentes agrupadas de acuerdo a la urgencia de nuevos tratamientos (prioridad crítica, alta y media), la cual tiene el objetivo de guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos. Dentro del grupo de prioridad crítica, se encuentran algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye a la especie *Eschericia coli* y dentro del grupo de prioridad alta se encuentran *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) y *Salmonella* spp. (7).

Con respecto a este tema, el Plan de Acción Nacional de los Estados Unidos (8) y el Reporte de la OECD sobre resistencia antimicrobiana en países G7 (9), señalan la necesidad e importancia del aumento de oportunidades para acelerar la

investigación sobre nuevos antibióticos y nuevas herramientas para combatir el problema de la resistencia antibiótica. Según el reporte de la OECD, las proyecciones realizadas para el 2050, indican que el número de muertes por año atribuibles a la resistencia antibiótica, colocarían a la resistencia como una de las primeras causas de muerte a nivel mundial.

Existen diversas propuestas para abordar este problema de resistencia, desde la estrategia de terapia hasta la producción de nuevas clases de antibióticos. La búsqueda de nuevos antibióticos en fuentes poco tradicionales o poco exploradas, como microorganismos marinos, plantas de la medicina tradicional, insectos, entre otros (10), han demostrado algunos casos exitosos como lo es el descubrimiento del antibiótico abyssomicina, obtenida a partir de una bacteria marina (11) o la teixobactina, obtenida a partir de una bacteria previamente no cultivada, aislada del suelo (12). En general sobre este último punto, sólo el 1% de las bacterias existentes han logrado ser cultivadas en condiciones de laboratorio (13–15), según los estudios de secuenciamiento metagenómico, por lo que estas también representan una fuente promisoría de nuevas clases de antibióticos.

Con respecto a las estrategias para bacterias no cultivables, es importante tomar en cuenta la aplicación de nuevas técnicas de cultivo que permiten abrir paso a fuentes no conocidas de nuevos antibióticos, como lo es el iChip (cultivo *in situ*) (16,17) o la técnica de co-cultivo, con la que se puede aprovechar la relación que tienen algunos microorganismos para influenciar su desarrollo mediante moléculas bioactivas o regulando ciertas vías metabólicas (18,19).

El enfoque sobre las fuentes microbianas nace principalmente por la gran biodiversidad existente y el desconocimiento de la capacidad que tienen para producir antibióticos (20), tomando en cuenta que los productos naturales poseen una mayor probabilidad de tener éxito en convertirse en una nueva droga debido al potencial de proveer novedad y complejidad espacial como en el número y configuración del carbono quiral, anillos e insaturaciones (número y posición) y grupos funcionales, a diferencia de los compuestos sintéticos, los cuales se basan en pequeños cambios químicos a partir de la estructura de drogas ya existentes (21).

Este trabajo tiene como objetivo buscar nuevas moléculas antibióticas producidas por las bacterias aisladas del tracto intestinal de la larva de *Hermetia illucens* ya que existen varios estudios que han demostrado que esta mosca saprófaga puede representar una fuente potencial de obtención de nuevas moléculas antibióticas (22–25).

## **II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La resistencia antibiótica es un evento biológico que ocurre de manera natural debido a procesos de mutación genética y a la capacidad de los microorganismos a transferir horizontalmente su material de información genética, sin embargo, constituye un problema a nivel mundial ya que genera, entre varios daños, pérdidas humanas.

Las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos será una de las principales causas de muerte a nivel mundial, según la OMS, sino actuamos prontamente. Se estiman que más de 63,000 personas adquieren infecciones en hospitales en los Estados Unidos y en Europa se estiman que 25,000 personas mueren anualmente a causa de infecciones por bacterias resistentes a múltiples drogas (26).

En el Perú y en Latinoamérica, la resistencia es un problema aún mayor ya que existen menos recursos para desarrollar estrategias de contención. Las infecciones por bacterias resistentes generan fallas en el tratamiento, lo cual prolonga la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte del paciente. A su vez, aumenta el consumo de antibióticos de segunda o tercera línea, cuyo costo y toxicidad son mayores que los de primera línea (27).

Los agentes infecciosos más importantes dentro de las infecciones intrahospitalarias, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, son

*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, entre otros (27). Por ejemplo, el 50% de *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos de pacientes en varios hospitales de Lima durante los años 2008 y 2009 resultaron ser resistentes al antibiótico meticilina. Para el caso de las enterobacterias, durante el 2008 y el 2011, se observó un 24% de resistencia de *Salmonella typhi* a ciprofloxacina y un 33% a ácido nalidíxico. Para el caso de *Escherichia coli*, se conoce que la tasa de producción de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales les confieren resistencia a ciertos antibióticos, son más altas en Latinoamérica que en otras partes del mundo. En Lima, el porcentaje de producción de BLEE por *E. coli* y *Klebsiella*, aisladas de hemocultivos de 9 hospitales durante el 2008 y 2009, fue del 75.1 y 76.8%, respectivamente (28).

Por otro lado, además de los casos de resistencia a nivel mundial, el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos ha venido disminuyendo, cuya causa es multifactorial (2). Esto representa un grave problema ya que muchos de los patógenos, como las bacterias más importantes que amenazan la salud, están desarrollando mecanismos de resistencia a los antibióticos que se encuentran disponibles actualmente en el mercado. Debido a la necesidad de buscar nuevas fuentes promisorias de moléculas antibióticas con estructuras novedosas que hagan frente al problema de la resistencia, el objetivo principal del presente trabajo es buscar compuestos con actividad antimicrobiana a partir del aislamiento, cultivo e identificación de bacterias del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens*.

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Historia del desarrollo de antibióticos**

Para poder entender el problema de la resistencia, resulta útil conocer la historia y el desarrollo de antibióticos. La exposición a sustancias antibióticas ocurrió mucho antes de la denominada “Era antibiótica” en donde se descubrieron la mayoría de dichas sustancias. Algunos estudios han reportado la existencia de trazas de tetraciclina en restos de esqueletos humanos ubicados en la Antigua Nubia Sudanesa que datan de 350 a 550 EC (29,30), lo cual indica que hubo exposición a materiales que contenían tetraciclina. Otro ejemplo es el uso de los suelos rojos del Río Jordán para tratamientos de infecciones dermatológicas que conllevó al posterior aislamiento y descubrimiento de actinomicetos productores de antibióticos (31).

Además de las posibles exposiciones a antibióticos previamente mencionadas, también se encuentra el uso de la medicina tradicional, especialmente la de China. El uso de plantas como *Artemisa annua*, generó el descubrimiento de la artemisinina, la cual ejerce una potente actividad contra la malaria (32). El consumo de estas y varias otras especies de plantas de uso tradicional, así como la exposición a antibióticos producidos por bacterias, probablemente hayan sido algunos de los factores que ocasionaron presiones de selección a lo largo de la historia y generaron la acumulación de genes de resistencia en poblaciones humanas incluso antes de la Era antibiótica (4).

La Era antibiótica surge a inicios de siglo XX cuando Paul Ehrlich encontró que algunos colorantes sintéticos pueden teñir tejidos de manera específica y por lo tanto pueden presentar algún tipo de afinidad para ser usados como drogas antimicrobianas. Esta idea conllevó a que él realice una búsqueda sistemática y a gran escala de drogas contra la bacteria *Treponema pallidum*, causante de la sífilis. Luego de sintetizar varios derivados organoarsénicos, la droga que logró tener éxito fue vendida como Salvarsan, hasta que fue reemplazada por la penicilina a inicios de la década de 1940 (33).

Sin embargo, antes del descubrimiento de la penicilina, esta búsqueda sistemática dio lugar al descubrimiento de las sulfonamidas por científicos de la compañía Bayer. Estas drogas sintéticas fueron las primeras en ser usadas como antimicrobianos y producidas a gran escala por varias compañías, lo que generó la mayor diseminación de casos de resistencia frente a estas drogas.

Antes del descubrimiento de la penicilina, se hacía uso del extracto de la bacteria *Pseudomonas aureginosa*, llamado piocianasa, para tratar varias enfermedades en hospitales durante 1899. Emmerich y Löw habían observado que esta bacteria tenía actividad contra bacterias patógenas, sin embargo, algunos preparados resultaron ser tóxicos para el humano por lo que este tipo de tratamientos fue dejado de lado. No es sino hasta 1945 en que se corrobora la producción de moléculas con actividad antibiótica por *P. aureginosa* (34).

El primer antibiótico descubierto de origen natural fue la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Tras 12 años de trabajar en la purificación y estabilidad de la sustancia activa producida por *Penicillium notatum*, Fleming estuvo a punto de abandonar esta idea hasta que, en 1940, un grupo de investigación de Oxford publicó un artículo donde describían los procedimientos para obtener cantidades suficientes de penicilina para ensayos clínicos (35). La metodología de cribado de Fleming, observando halos de inhibición sobre capas de bacterias patógenas en agar, fue ampliamente usada por otros investigadores en el ámbito académico e industrial para la detección de actividad de otros microorganismos productores de antibióticos.

Estos hallazgos prepararon el camino para el descubrimiento de nuevos antibióticos entre los años 1950 y 1970, en donde la mayoría de clases de antibióticos fueron descubiertas a través del aislamiento de microorganismos de diferentes e inusuales ambientes naturales. Luego de esta era dorada, no se han encontrado nuevas clases de antibióticos por lo que se ha venido realizando modificaciones químicas de los antibióticos ya existentes y tratamientos combinatorios con diferentes mecanismos de acción para hacer frente al problema de la resistencia (4,36).

### **2.2.2 La resistencia antibiótica**

La resistencia antibiótica hace referencia a la falta de inhibición efectiva del crecimiento de un microorganismo ya que este continúa multiplicándose a concentraciones terapéuticas de la droga. Años antes del uso de la penicilina,

como tratamiento clínico, se observó que algunas bacterias podían degradarla. De igual manera, mientras se daba estreptomycinina como tratamiento para la tuberculosis durante la década de 1940, empezaron a aumentar los casos de cepas mutantes a medida que el tratamiento continuaba (37). Este y otros casos de resistencia fueron volviéndose más comunes durante el descubrimiento e introducción de otros antibióticos a la práctica clínica.

En la Figura 2 se puede observar una representación del descubrimiento de antibióticos (flechas verdes) y la aparición de los casos de resistencia (lado derecho) para cada tipo de antibiótico. Las flechas rojas indican que la resistencia ha ido aumentando junto con la falta de descubrimientos de nuevas clases de antibióticos.

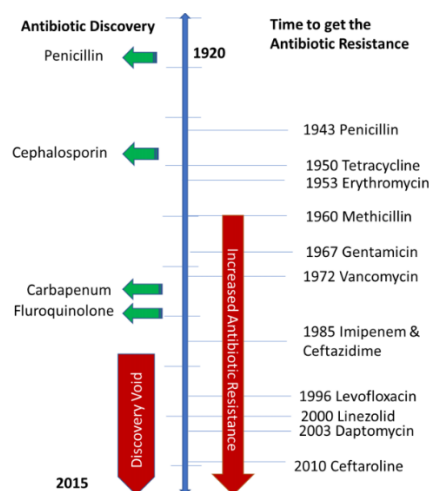


Figura 2. Representación gráfica del descubrimiento de antibióticos y primeros reportes de resistencia (26).

A mediados de la década de 1950, un grupo de investigadores en Japón encontraron que la resistencia podía ser transferida genéticamente y, en consecuencia, esta podría diseminarse a poblaciones enteras de bacterias (38).

Asimismo, el descubrimiento de secuencias de genes bacterianos presentes en genomas eucariotas, la identificación de islas con genes de patogenicidad (39) y la transferencia de resistencia mediada por plásmidos, señalan la importancia que merecen las investigaciones en estos ámbitos (37,40).

Los antibióticos usados en agricultura son similares a los usados en el humano por lo que la cadena alimenticia es considerada la principal fuente de transmisión de bacterias resistentes entre plantas, animales y humanos (26). Por ejemplo, en Barcelona, la cuarta parte de niños son portadores de *E. coli* resistente a quinolonas, sin embargo, estos niños nunca se encontraron expuestos al antibiótico, por lo que se sugirió que las aves de corral o el cerdo podrían ser las principales fuentes de bacterias resistentes (41).

Si bien los antibióticos ejercen una presión de selección, el desarrollo de la resistencia también se ve directamente relacionado con la transferencia de material genético entre bacterias, como se mencionó previamente. El nivel de consumo de estos antibióticos también está asociado al desarrollo de la resistencia ya que aquellas que logran sobrevivir al tratamiento, logran acumular mayor capacidad para resistir a ese y otros antibióticos. Cabe mencionar que la resistencia a un determinado antibiótico, por ejemplo, a la tetraciclina, puede incurrir en la resistencia a otros antibióticos de su misma clase (estructuralmente relacionados), por ejemplo resistencia a oxitetraciclina o doxiciclina (26)

Algunos mecanismos de resistencia pueden clasificarse por el daño a: (i) la síntesis de pared bacteriana, (ii) la síntesis de proteínas, ADN y ARN, (iii) la membrana celular o (iv) acciones específicas (26). Sin embargo, algunos últimos estudios indican que no todas las interacciones del antibiótico con las bacterias pueden ser explicadas por mecanismos únicos y específicos, sino que los antibióticos pueden operar a nivel de población o realizar interacciones complejas con el biofilm bacteriano (42,43).

### **2.2.3 Insectos y su microbiota intestinal**

Los insectos son los animales más abundantes en número y en biomasa y se encuentran en casi todos los espacios terrestres. Se han descrito más de un millón de especies de insectos, los cuales representan más del 70% de las especies animales (44). La diversidad de insectos se ve reflejada en la gran variedad de las comunidades microbianas presentes en su tracto digestivo. Esta gran variedad se encuentra influenciada por la dieta de cada insecto, sin embargo, aquellas comunidades microbianas indígenas o no transitorias, juegan un rol importante en la colonización de especies patógenas o especies transitorias (45).

Los insectos normalmente consumen microorganismos potencialmente dañinos o patógenos que provienen de su dieta o del ambiente en el que viven. A pesar de que se enfrentan constantemente a dichos microorganismos dañinos, es claro notar su resistencia a infecciones microbianas ya que se desarrollan casi siempre de manera próspera en este tipo de ambientes (46). Esta resistencia ocurre debido a los diferentes mecanismos de defensa con las que cuentan los insectos, que

incluye el sistema inmunitario, las barreras fisicoquímicas (como el pH) en el tracto intestinal y la microbiota intestinal (47).

Las bacterias del tracto intestinal de los insectos han mostrado tener roles importantes proporcionando vitaminas, colaborando en el metabolismo de grasas y carbohidratos, previniendo la invasión de bacterias externas y promoviendo la función del sistema inmune. Por ejemplo, un estudio logró aislar y cultivar a la bacteria *Enterococcus mundtii* a partir del tracto intestinal del insecto lepidóptera *Spodoptera littoralis*. Dicha bacteria simbiótica secreta activamente la bacteriocina mundticina KS, la cual tiene un efecto protector sobre la invasión de bacterias patógenas en este insecto (44).

En un estudio se demostró que si se altera la dieta del insecto *Coptotermes formosanus* (Blattodea), las comunidades microbianas del intestino también cambian y que aquellos que son capaces de degradar los componentes de la dieta se vuelven las especies predominantes (48). Asimismo, otro análisis comparativo de la composición intestinal bacteriana de *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera) encontró diferencias entre larva y adultos y entre tipos de dietas administradas (49).

Usando técnicas modernas de biología molecular se ha podido identificar la diversidad microbiana y las especies dominantes en varios insectos, muchas de las cuales aún no han logrado ser cultivadas (50). Cabe resaltar que el gen del ARN ribosomal 16S ha mostrado ser un buen indicador de filogenia pero que existe la

posibilidad de que algunos tipos filogenéticos detectados sean únicos a la microflora intestinal del insecto que se estudie. Algunos filos comunes de la microbiota intestinal incluyen a: *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y especies de *Bacillus*, *Actinomicetos*, *Actinobacteria*, entre otros (51). Adicionalmente, también es común encontrar especies del reino Fungi, principalmente en insectos que se alimentan de detritus o madera, ya que estas especies pueden contribuir con la digestión del insecto (52).

#### **2.2.4 *Hermetia illucens* o Mosca soldado negra**

*Hermetia illucens* (black soldier fly o BSF) es una mosca tropical originaria de América del Norte (sur de EEUU) pero que logró expandirse a Europa, India, Asia y Australia luego de la segunda guerra mundial. Actualmente su distribución se ha ampliado a casi todas las zoogeográficas del planeta con temperaturas cálidas (53). Su clasificación taxonómica (Linnaeus, 1758) es la siguiente:

- Filo: Arthropoda
- Clase: Insecta
- Orden: Diptera
- Familia: Stratiomyidae
- Subfamilia: Hermetiinae
- Género: *Hermetia*
- Especie: *illucens*

Esta especie posee 4 estadios dentro de su ciclo biológico (huevos, larvas, pupas y adultos), como se observa en la Figura 3, pero también el ciclo se puede dividir en instar, siendo este un término menos usado (54). Todo el ciclo biológico tiene

como duración promedio de 30 días, dependiendo de las condiciones ambientales en su medio natural y la dieta (55), siendo el estadio larval el único en el que se alimentan. Durante el estadio adulto sólo beben agua y la prioridad será reproducirse y ovipositar los huevos de manera que alcancen exitosamente su desarrollo (56). Debido a esto, es que no se suelen congregan alrededor de las viviendas y esto reduce la probabilidad de diseminar infecciones, como si ocurre con la mosca casera o *Musca domestica*.

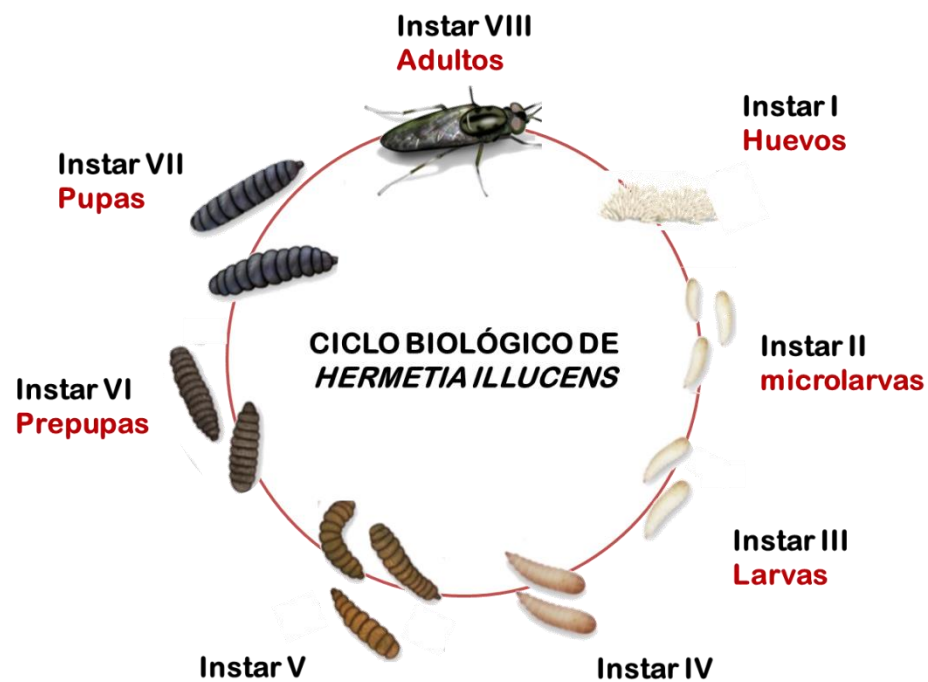


Figura 3. Ciclo biológico de *Hermetia illucens*

En condiciones de laboratorio, otros estudios indican que la hembra oviposita entre 320 a 620 huevos y luego de la eclosión, las microlarvas buscan una fuente de alimento que tenga una humedad aproximada de 60 y 90% (57) y una temperatura de 27 a 33°C para poder lograr un crecimiento óptimo (58). Estos

nutrientes provienen principalmente de materia orgánica en descomposición, como frutas, vegetales y restos de animales (59). Durante el estadio de adultos, una fuente de luz ha demostrado ser estimulante para la reproducción exitosa, así como una fuente de agua que incrementa su longevidad y el fitness del adulto (59). Al final de su estadio larval (prepupas), estas suelen moverse lejos de la fuente de alimento y a un área limpia hasta que están listas para transformarse en moscas adultas (60).

Entre otras especies de moscas, *H. illucens* es la que tiene mayor eficiencia en procesar materia orgánica y debido a que su estadio larval tiene una mayor duración que otras especies, estas tienen un mayor tamaño y consumen también mayores cantidades de alimento. Esta propiedad de las larvas ha permitido que puedan ser ampliamente usadas para el manejo de desechos orgánicos, teniendo cada tipo de desecho orgánico, una tasa de consumo diferente (61).

### **2.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El descubrimiento de antibióticos naturales a inicios del siglo 20 tuvo un gran impacto en la salud humana ya que se trataron rápidamente varias infecciones microbianas de la época. Los productos naturales son una pieza clave en la medicina moderna y continúan siendo la fuente principal de moléculas líderes en el descubrimiento de drogas. Más de la mitad de productos naturales que se conocen provienen de una fuente bacteriana (62), los cuales fueron en su mayoría

obtenidos a partir de bacterias filamentosas, actinomicetos, myxobacterias, cianobacterias, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* (63).

Existen estudios que han demostrado que el tracto intestinal de los insectos tiene roles importantes, como prevenir la invasión de bacterias patógenas y promover la función de su sistema inmune (64). La mosca soldado negra compete con otras especies de moscas que sobreviven en desechos orgánicos en descomposición y transmiten así enfermedades. La mosca soldado negra también evita la ovoposición de la mosca casera o *Musca domestica* (61). Las larvas de esta mosca han sido principalmente utilizadas para la reducción de los desechos orgánicos ya que posee la capacidad de desarrollarse en ambientes contaminados.

La larva de *Hermetia illucens* modifica la microflora presentes en dichos desechos, disminuyendo la presencia de bacterias patógenas al producir componentes bacteriostáticos, bactericidas, fungicidas (24). A modo de ejemplo, se ha encontrado que disminuye la presencia de *Escherichia coli* en restos lácteos (23) y en restos de aves de corral (22).

Asimismo, se ha encontrado que extractos de las larvas de *H. illucens* poseen compuestos con actividad antibacteriana, lo cual brinda evidencias y una nueva perspectiva con respecto a los efectos antimicrobianos de la larva de *H. illucens* (25). Adicionalmente, otro estudio logró aislar e identificar un nuevo péptido obtenido a partir de su hemolinfa con actividad antimicrobiana contra varias cepas

de *Staphylococcus aureus* e incluso contra una cepa resistente a múltiples drogas (65).

Por otro lado, también se ha estudiado la diversidad microbiana de los distintos estadios del ciclo biológico de *H. illucens* mediante secuenciamiento del gen del ARNr 16S, indicando que existe una gran diversidad bacteriana asociada a esta especie (66) e incluso se ha logrado aislar e identificar dos nuevas especies de bacterias aisladas a partir del tracto intestinal de esta larva (67,68).

En el presente estudio se plantea aislar, cultivar e identificar a los microorganismos del tracto intestinal de la larva *H. illucens* enfrentándolos contra bacterias patógenas para de descubrir antibióticos.

## **2.4 OBJETIVOS**

### **2.4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Buscar compuestos con actividad antimicrobiana a partir del aislamiento, cultivo e identificación de bacterias provenientes del tracto intestinal de la larva de *Hermetia illucens*.

### **2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar y cultivar bacterias del tracto intestinal de la larva de *Hermetia illucens*
- Identificar las cepas aisladas del tracto intestinal de la larva de *Hermetia illucens* mediante el secuenciamiento del ARNr 16S.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas mediante el enfrentamiento contra 3 cepas patógenas: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Salmonella enterica* ATCC 13311 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del aislamiento biodirigido contra las 3 cepas patógenas (ATCC).

## **2.5 HIPÓTESIS**

Es posible realizar la búsqueda de antibióticos a partir de microorganismos aislados del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens*.

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

###### 3.1.2.1 Larvas de *Hermetia illucens*

Las larvas utilizadas para el aislamiento de microorganismos provienen de la crianza estandarizada para el mantenimiento continuo del ciclo biológico de *Hermetia illucens*, realizada en el bioterio (018) acondicionado para dichas condiciones, del Laboratorio de parasitología celular (208) – LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

###### 3.1.2.2 Cepas bacterianas

Para el desarrollo de los ensayos de enfrentamiento bacteriano y de evaluación de la actividad antimicrobiana se usaron las siguientes cepas patógenas: *Escherichia coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 13311<sup>TM</sup> y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 43300<sup>TM</sup> Methicillin resistant (MRSA). Como control positivo de la prueba enzimática de lipasa se usó a la bacteria *Pseudomona aureginosa* ATCC® 27853<sup>TM</sup>.

## 3.2 MÉTODOS

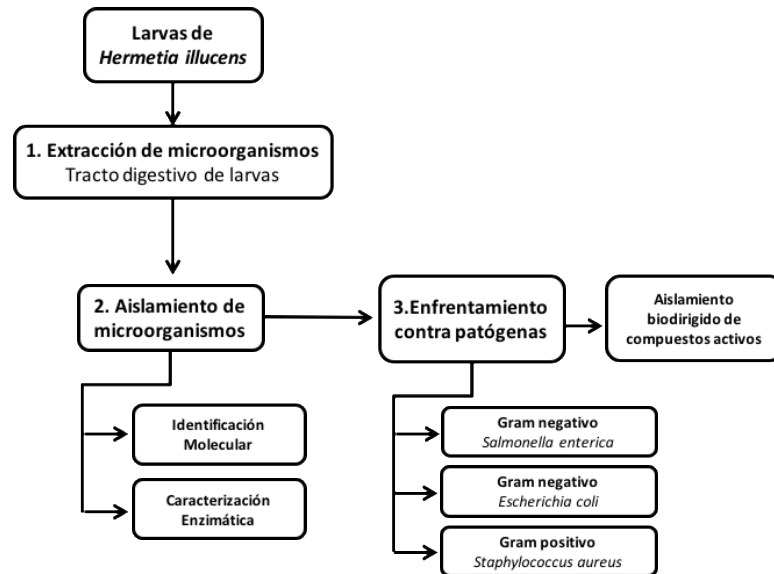


Figura 4. Esquema general de la metodología

### 3.2.1 Crianza de larvas y mantenimiento de ciclo biológico de *Hermetia illucens*

El mantenimiento del ciclo biológico de la mosca soldado negra o BSF (Black Soldier Fly) en condiciones de laboratorio permite obtener larvas en diferentes periodos de tiempo y experimentar diferentes tipos de alimentos que varían la microbiota presente en su tracto intestinal, como se mencionó previamente. Por este motivo es importante mantener el ciclo biológico de este organismo ya que describe cómo esta mosca puede ser criada para este y otros tipos de estudios futuros.

Debido a que naturalmente *H. illucens* vive en zonas tropicales, la temperatura óptima de crecimiento y desarrollo se encuentra alrededor de los 27°C con una

humedad entre 60-70% (56,57), condiciones que fueron usadas y mantenidas en el laboratorio.

Las moscas adultas requieren de luz visible para el apareamiento y oviposición, dando inicio al ciclo biológico. Durante los 2 días después del apareamiento, los huevos fueron colectados para su eclosión hacia microlarvas, lo cual puede tomar hasta 4 días. Inmediatamente después de la eclosión, estas microlarvas fueron colocadas sobre una fuente de alimento para que se desarrollen a larvas durante los siguientes 15 días.

Luego de los 15 días, las larvas se han desarrollado hasta llegar al estadio de prepupa, tiempo en el cual ha consumido todos los nutrientes necesarios para sobrevivir la etapa de pupa y adulto en la que no se alimentan por falta de piezas bucales funcionales. Estas prepupas fueron colocadas en otros contenedores para favorecer el proceso de transformación a moscas o pupación. Esta transformación puede tardar hasta 15 días. Luego de que los adultos emergen, están listos para aparearse y dejar huevos. Si bien los adultos no se alimentan, se les coloca una fuente de agua, la cual incrementa su tiempo de vida (59), logrando vivir de 5 a 8 días.

Todo el sistema de crianza, incluyendo la verificación de la humedad y la temperatura se realizan de manera continua en el laboratorio para asegurar la continuidad del ciclo biológico de *Hermetia illucens* en óptimas condiciones.

### **3.2.2 Extracción del tracto intestinal de larvas de *Hermetia illucens***

Se seleccionan 5 larvas entre 8 y 11 días con un tamaño entre 10 y 20mm. Para evitar la contaminación del aislamiento de bacterias del tracto intestinal con las bacterias de la superficie de la larva, estas fueron desinfectadas superficialmente con abundante alcohol al 70% y luego lavadas con agua destilada (24). Para facilitar la disección y disminuir el movimiento de las larvas, estas son mantenidas a 4°C por 30 minutos dentro de una placa petri y antes de iniciar la disección se les colocan bajo luz UV por 15 minutos, para desinfectar nuevamente la superficie de la larva. Para la extracción del tracto intestinal, se hace un corte lateral en la larva y se extrae el tracto intestinal completo con la ayuda de unas pinzas estériles. Las muestras son colocadas en un tubo de 1.5ml conteniendo 200µl de solución salina y se homogeniza con ayuda de una pipeta. Las muestras en solución salina son filtradas con una membrana de 40µm de porosidad (cell strainer) con la finalidad de triturar el tejido epitelial y homogenizar la muestra recolectada.

### **3.2.3 Aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal**

La muestra del homogenizado anterior es diluida hasta 1/10000 (Figura 5), dilución que permite observar colonias separadas en dichos medios de cultivo. Se colocan 10µl de la dilución sobre los siguientes medios: Agar Infusión Cerebro-corazón con cloruro de trifeniltetrazolio (BHA), agar Luria Bertani (LBA) (24) y agar sangre (AS, Agar Columbia + 5% sangre). La alícuota es sembrada por extensión sobre la superficie del agar. Para el repique de colonias y obtención de

cultivos puros se utiliza agar tripticasa de soya (TSA) (68). Las placas se incuban en un ambiente de aerobiosis a 30°C por 24 horas.

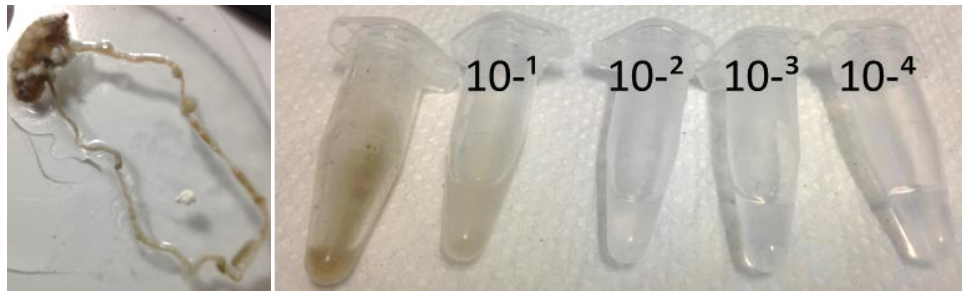


Figura 5. Disección del intestino de una larva (izquierda) y diluciones del homogenizado del contenido intestinal en solución salina (derecha)

### 3.2.4 Caracterización enzimática de las bacterias aisladas

Luego de la incubación, las placas de BHA, LBA y AS son analizadas para diferenciar y contabilizar la presencia de distintos tipos de colonias o morfotipos. Cada morfotipo es aislado y sembrado en una nueva placa de agar TSA para poder obtener un cultivo puro de dicha colonia. Esto se verifica mediante la tinción Gram luego de algunos repiques en TSA, con la cual se hace una diferenciación bacteriana como Gram positivas o Gram negativas. Adicionalmente, se realizan las siguientes pruebas para conocer la actividad enzimática de las cepas obtenidas: catalasa, oxidasa, ureasa, amilasa, celulasa, proteasa y lipasa. Los ingredientes de los medios de cultivo utilizados para cada prueba enzimática se encuentran resumidos en el Anexo N°3.

La prueba de catalasa permite conocer si la bacteria produce esta enzima cuando la colonia es expuesta a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2 + catalasa \rightarrow H_2O + O_2$ ) y es considerada positiva sólo si se producen burbujas o efervescencia y negativa si hay poco o nada de burbujas (69). Para esta prueba se agregó 1ml de peróxido

de hidrógeno en un tubo de 1.5ml y con un asa de siembra se inocularon colonias bacterianas y se observó la presencia o ausencia de reacción.

La prueba de oxidasa permite determinar la presencia de enzimas citocromo C oxidadas, las cuales participan en la cadena transportadora de electrones y en las vías metabólicas del nitrato de algunas bacterias. El procedimiento consiste en colocar la colonia en tiras impregnadas con el reactivo dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio y 1-naftol, que se oxida por la citocromo oxidasa y se considera positiva si dentro del minuto, la zona impregnada vira a un color azul violeta. Se recomienda usar asas de platino, madera o plástico para evitar resultados falsos positivos (69).

La ureasa es una enzima que hidroliza la urea en amonio, dióxido de carbono y agua. La presencia de la enzima se determina al inocular colonias bacterianas en un medio que contiene urea y un indicador. Si la enzima está presente, el amonio liberado incrementará el pH del medio y por lo tanto el indicador de pH rojo de fenol cambiará de color de amarillo a violeta, dando como resultado una prueba positiva (69).

Para las pruebas proteasa, amilasa, celulasa y lipasa se usaron cultivos bacteriano en caldo LB para el sembrado lineal sobre el medio de cada prueba (Figura 6). En estas 4 pruebas las placas fueron incubadas por 48 horas a 30°C. Para cada prueba se usaron las siguientes cepas ATCC cuya actividad enzimática es positiva para dichas pruebas enzimáticas:

Tabla 1. Bacterias utilizadas como control positivo para cada prueba enzimática.

<b>Prueba enzimática</b>	<b>Cepa control</b>	<b>Cepa</b>
<b>Amilasa</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<b>Lipasa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Celulasa</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<b>Proteasa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Ureasa</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453
<b>Oxidasa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Catalasa</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Para la preparación del medio de proteasa se utilizaron 0.5% de digerido pancreático de caseína, 0.25% de extracto de levadura, 0.1% de glucosa, 1% de leche descremada y 1.5% de agar. Luego de las 48 horas de incubación, se realiza la lectura del halo alrededor de la colonia, el cual se observa en caso se secreten enzimas proteolíticas que hidrolicen la caseína, considerando a la prueba como positiva.

Para la preparación del medio de amilasa se requiere de un medio sólido que contenga 0.3% de extracto de carne, 2% de almidón soluble, 0.5% de peptona, 0.5% de NaCl y 1.5% de agar. Luego de las 48 horas de incubación, se hace el revelado agregando un volumen de una solución de lugol al 2% que cubra toda la superficie de la placa (24). La lectura es inmediata y si se observa la presencia de una zona alrededor de la colonia sin coloración, la prueba se considera como positiva.

Para el medio de celulasa se requiere 1% de carboximetil celulosa de sodio, 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 1.5% de agar. Para el revelado se cubre la superficie del medio con rojo Congo al 0.1% durante 15 minutos para luego eliminar el exceso con una solución de NaCl al 0.5% (24) que hace visible la presencia o ausencia del halo. Para la preparación del medio de proteasa se usa 0.5% de digerido pancreático de caseína, 0.25% de extracto de levadura, 0.1% de glucosa, 1% de leche descremada y 1.5% de agar (24). Luego de las 48 horas de incubación, se realiza la lectura del halo alrededor de la colonia (zona sin coloración) y en caso este presente, la prueba se considera positiva.

El medio de lipasa contiene una solución de Tween 80 al 0.5% y rojo neutro 0.1 m/v al 2% en buffer fosfatos 0.067M pH 7 (fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico). En este caso, se agregan 20µl del cultivo en caldo en el medio para lipasa. Si el medio cambia hacia una coloración rojiza antes de los 5 días, la prueba se considera positiva (70).

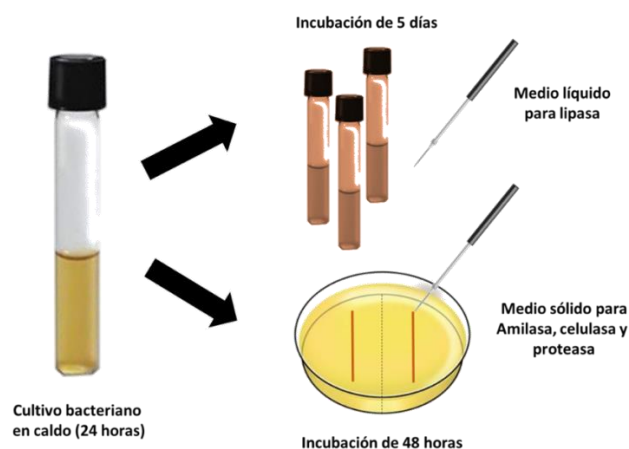


Figura 6. Procedimiento de inoculación de medios para pruebas las enzimáticas

### **3.2.5 Criopreservación y reconstitución de cepas aisladas**

Para la criopreservación se preparan 3 crioviales por cepa. Cada criovial contiene 1ml de caldo BHI con glicerol al 20%, suero fetal bovino al 20% y una asada del cultivo de la cepa. Todos los crioviales fueron almacenados a -70°C. Esto asegura la disponibilidad de las cepas para los futuros ensayos de enfrentamientos bacterianos y caracterización molecular.

### **3.2.6 Extracción de ADN y amplificación del gen ARN ribosomal 16S**

Las cepas reconstituidas sembrándolas en placas de TSA e incubándolas durante a 30°C por 24 horas , tiempo luego del cual se cosecharon las colonias crecidas en TSA dentro de tubos conteniendo perlas de vidrio de 2mm de diámetro con 500µl de buffer TE (Tris-EDTA), previamente autoclavados. Se añadieron 50µl de lisozima (100mg/mL), se homogenizó en vortex y se incubó a 37°C durante 16 horas. Luego de la incubación, se agregaron 75µl de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% y 20µl de enzima proteinasa K (20mg/mL), se homogenizó e incubó por 3 horas a 65°C.

Posteriormente, se añadieron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl CTAB (cetiltrimetilamonio)/NaCl (previamente calentado a 65°C), se homogenizó e incubó durante 10 minutos a 65°C. Se adicionó 750 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se homogenizó en vortex y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se adicionó 750 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos. Nuevamente, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y

se añadió 1mL de alcohol absoluto frío y se colocó a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Se centrifugó a 10 000 rpm por 8 minutos y luego se descartó el sobrenadante. Se agregó 1mL de alcohol al 70% y se centrifugó a 10 000 rpm por 3 minutos.

Finalmente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet colocando el tubo boca abajo con la tapa abierta sobre un papel toalla. El ADN fue eluido en 100  $\mu\text{l}$  de buffer TE. Las soluciones utilizadas fueron:

Tabla 2. Soluciones utilizadas para extracción de ADN genómico

<b>Buffer TE</b>	<b>CTAB/NaCl</b>
Tomar un volumen (mL) de 1M de Tris-HCl pH 8 y otro de 0.5 M EDTA pH 8 y ajustar el volumen a 10mL. <b>(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8)</b>	Pesar 4.1g de NaCl y 10g de CTBA y disolver en 100mL de agua destilada, la cual ha sido calentada a $65^{\circ}\text{C}$ . Homogenizar hasta que el contenido se vuelva blanco e incubar 10 minutos a $65^{\circ}\text{C}$ , previo a su utilización.

Se realizó la verificación de la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (40mM acetato de Tris, 2mM EDTA, pH 8.5). Asimismo, se empleó marcador fago lambda (10ng/ $\mu\text{l}$ ) para realizar la cuantificación de la muestra. La corrida electroforética se realizó a 80V durante 40 minutos. Se utilizó bromuro de etidio para visualizar las bandas con el respectivo peso molecular.

Para la preparación de buffer TAE se usó:

Tabla 3. Preparación de Buffer Tris, ácido acético y EDTA (TAE)

50X Buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA)
Pesar 242g de Tris base, 57.1 mL ácido acético glacial y 100mL 0.5M EDTA (pH 8.0). Luego tomar 20mL de TAE 50X y ajustar el volumen a 1 litro de TAE 1X.

La amplificación se realizó empleando los primers externos 8 Forward y 1492 Reverse obteniendo un producto de PCR de aproximadamente 1490 pb, tal como se muestran en la Figura 7.

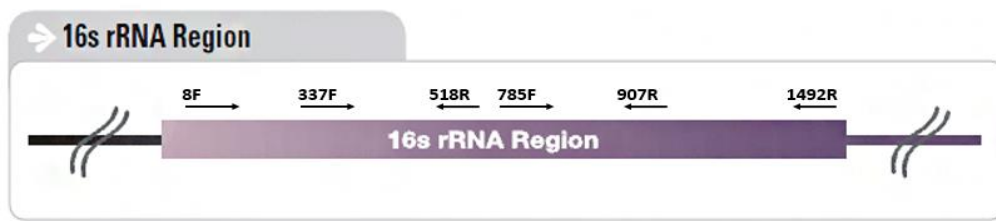


Figura 7. Esquema de la ubicación de primers empleados para la amplificación y secuenciamiento del gen ribosomal 16S

Para la estandarización de las condiciones de PCR, inicialmente se empleó la enzima High Fidelity (Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix de Thermo Fisher Scientific), para la amplificación de productos de PCR, empleando las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones empleadas en el master mix de PCR

Reactivo	Stock de trabajo	Concentración final (1X)	Volumen para 1 rxn
Agua PCR	-	-	6µl
Master Mix (Phusion)	2X	1X	10µl
16s_8F	10µM	0.5µM	1µl
16s_1492R	10µM	0.5µM	1µl
ADN			2µl
<b>Volumen final</b>			20 µl

**Secuencia de los primers:**

16s\_8F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

16s\_1492R 5' CGYTTACCTTGTTACGACTT 3'

**Condiciones finales de ciclamiento:**

Tabla 5. Condiciones estandarizadas de ciclamiento para amplificación del gen ribosomal 16S

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Denaturación inicial</b>	98°C	30''	1
<b>Denaturación</b>	98°C	1''	30
<b>Alineamiento</b>	55°C	5''	30
<b>Extensión</b>	72°C	23''	30
<b>Extensión final</b>	72°C	1'	1

Para la verificación del producto de PCR se realizaron corridas de electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando marcador molecular 1Kb (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen) y buffer TAE 1X. La corrida de electroforesis se realizó a 80V durante 40 minutos. Se utilizó bromuro de etidio para visualizar las bandas con el respectivo peso molecular.

Como ejemplo, la Figura 8 muestra el gel de agarosa con los amplicones obtenidos de 9 cepas aisladas de la larva (M1 a M9). Las bandas presentan el peso de aproximadamente 1500pb pero se evidencia presencia de *smears* o manchas en todas las muestras.

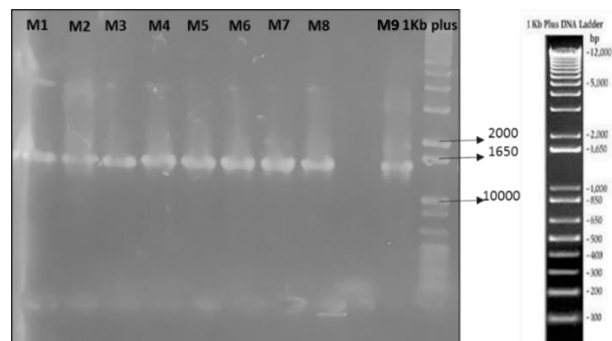


Figura 8. Gel de agarosa al 1% con amplicones de aproximadamente 1500pb  
Gel de agarosa: Carril 1 a 9 contiene productos de PCR del gen ARN ribosomal 16S de 9 cepas (M1 a M9); último carril contiene marcador de peso molecular de ADN 1Kb plus

La Figura 9, muestra los productos de PCR a diferentes condiciones, donde a 55°C la presencia de *smears* se observan en menor proporción que los productos amplificados a 52°C, considerándolo como mejores condiciones para la amplificación.

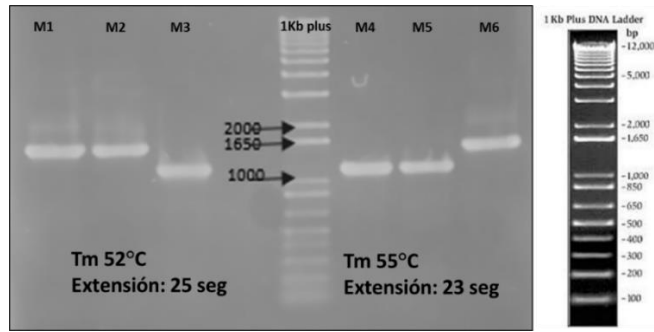


Figura 9. Gel de agarosa al 1% con amplicones obtenidos a diferentes condiciones Gel de agarosa: Carril 1 a 3 contiene amplicones (cepa M1 a M3) obtenidos a una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 52°C y un tiempo de extensión de 25 segundos; carril de 5 a 7 (cepa M4 a M6) contiene amplicones obtenidos a  $T_m$  de 55°C y un tiempo de extensión de 23 segundos; carril 4 (al medio) contiene marcador de peso molecular de ADN 1Kb plus

Los productos que presentaron *smears* fueron purificados con kit (Qiaex II gel extraction kit) y verificados nuevamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio, tal como se muestra en la Figura 10, donde se evidencia una única banda para cada muestra.

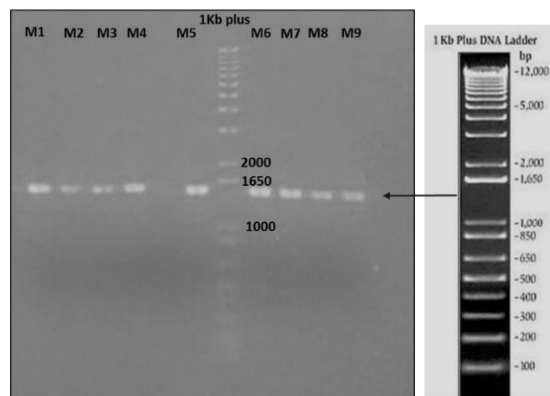


Figura 10. Gel de agarosa al 1% con amplicones purificados de aproximadamente 1500pb. Gel de agarosa: Carriles con amplicones purificados de 9 cepas (M1 a M9); carril 6 contiene marcador de peso molecular de ADN 1Kb plus

Para completar la amplificación de productos de PCR de las demás muestras se empleó la Phusion High – Fidelity DNA Polymerase 500U (Thermo Scientific), empleando las siguientes condiciones:

Tabla 6. Condiciones empleadas en el master mix de PCR

Reactivo	Stock de trabajo	Concentración final (1X)	Volumen para 1 rxn
Agua PCR	-	-	29.5µl
Buffer PCR	5X	1X	10µl
dNTP's	2.5MM	800µM	1µl
16s_8F	10mM	0.5mM	2.5µl
16s_1492R	10mM	0.5µM	2.5µl
DMSO			1.5 µl
Phusion pol			1µl
ADN			2µl
Volumen final			50 µl

**Condiciones finales de ciclamiento:**

Tabla 7. Condiciones estandarizadas de ciclamiento para amplificación del gen ribosomal 16S

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	98°C	30''	1
Denaturación	98°C	10''	30
Alineamiento	55°C	30''	30
Extensión	72°C	45''	30
Extensión final	72°C	10''	1

### Verificación del producto de PCR

La verificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando marcador molecular 1Kb (1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen) y buffer TAE 1X. La corrida electroforética se realizó a 80V durante 40 minutos. Se utilizó bromuro de etidio para visualizar las bandas con el respectivo peso molecular.

La Figura 11 muestra el gel de electroforesis con los amplicones correspondientes a muestras de bacterias. Las bandas presentan el peso adecuado de aproximadamente 1500pb sin presencia de *smear*.

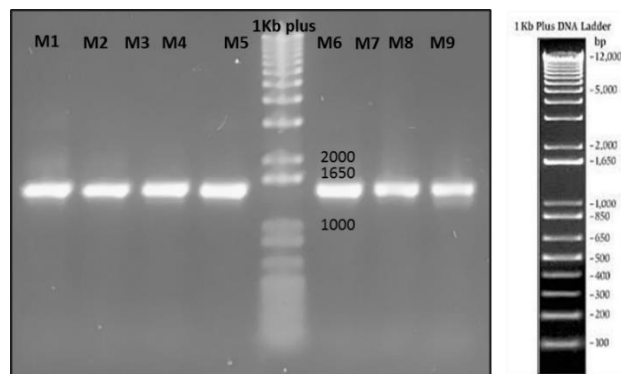


Figura 11. Gel de agarosa al 1% con amplicones bacterianos empleando Phusion High – Fidelity DNA Polymerase

Gel de agarosa: Carriles con amplicones de 9 cepas (M1 a M9); carril 6 contiene marcador de peso molecular de ADN 1Kb plus

### **3.2.7 Secuenciamiento y análisis del gen del ARN ribosomal 16S bacteriano**

Los fragmentos de amplificación obtenidos fueron secuenciados por la empresa MACROGEN USA mediante el secuenciamiento por terminador fluorescente (Sanger). Los primers internos: 337F, 518R, 785F, 907R y externos: 8F y 1492F, fueron empleados para el secuenciamiento (Tabla 8) (72). Los cromatogramas de

las secuencias del gen de ARN ribosomal 16s se editaron y se ensamblaron con el programa CLC Main Workbench 7. El alineamiento de la secuencia de cada cepa contra la base de datos se realizó mediante la herramienta web *Nucleotide BLAST*® del Centro Nacional para la información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Tabla 8. Secuencias de primers usadas para el secuenciamiento

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
16s_337F	5' GACTTCTACGGGAGGCWGCAG 3'
16s_785F	5' GGATTAGATACCCTGGTA 3'
16s_518R	5' GTATTACCGCGGCTGCTGG 3'
16s_907R	5' CCGTCAATTCCTTTRAGTTT 3'

### **3.2.8 Ensayos de enfrentamiento entra cepas aisladas y bacterias patógenas ATCC**

Para detectar la actividad antimicrobiana de cada cepa aislada del tracto intestinal de las larvas de *H. illucens* contra las cepas bacterianas patógenas (*E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* MRSA), se utilizó la metodología de bloque de agar o *Agar slab method* (73) (Figura 11). Generalmente, estas pruebas se realizan en medios sólidos, los cuales permiten observar de manera cualitativa o semicualitativa, zonas de inhibición del crecimiento ejercido por parte de las bacterias de interés, en este caso, las cepas del tracto intestinal.

Para esta metodología se usaron 15ml de AN a 45°C, el cual fue inoculado con  $5 \times 10^5$  UFC/ml de cultivo de cada una de las cepas aisladas e incubado por 24

horas a 30°C. Luego de la incubación, se cortaron bloques de agar de 8mm de diámetro con ayuda de un sacabocado metálico estéril. Los bloques fueron colocados sobre placas con 15ml de AN recientemente inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC/ml del cultivo de 24 horas de crecimiento de cada bacteria patógena ATCC. Luego de 24 y 48 horas de incubación a 30°C, se verificó la presencia de zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los bloques de agar. Adicionalmente, se colocaron 56.25µl de una solución a 6mg/ml de tetraciclina en DMSO en 15ml de AN a 45°C y de igual manera que para las cepas, se cortaron bloques de agar de 8mm de diámetro colocados sobre la placa de AN que contiene a las bacterias patógenas.

### **3.2.9 Aislamiento biodirigido de compuestos extraídos de cultivo líquido de cepa aislada activa contra las cepas patógenas ATCC**

#### Condiciones de cultivo

Para obtener un pre cultivo, la cepa activa seleccionada (BGS8\_5) fue repicada, a partir de una sola colonia en placa de TSA (crecimiento de 24 horas), en 60ml de caldo LB e incubada por 24 horas a 30°C con agitación constante de 150 RPM.

Para la estimulación del cultivo de la cepa seleccionada con *E. coli* ATCC 25923 térmicamente inactivada, se prepararon 100ml de caldo LB inoculado con una colonia de *E. coli* ATCC 25923 en TSA (crecimiento de 24 horas). El caldo inoculado fue incubado a 37°C por 24 horas con agitación constante de 150 RPM. El cultivo luego fue centrifugado a 5000 RPM por 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100ml de PBS 1X estéril para la

inactivación térmica de la bacteria en autoclave durante 15 minutos a 121°C a 15 psi (*pounds force per square inch*). Esto fue nuevamente centrifugado para la obtención del pellet bacteriano inactivado, el cual fue resuspendido en caldo LB y agregado al cultivo para la estimulación de la bacteria de interés. Se comprobaron los controles de esterilidad del medio de cultivo y se verificó la pureza del cultivo de la cepa BGS8\_5 en placa. Para la verificación de la esterilidad del pellet de *E. coli* térmicamente inactivado (TI), luego del proceso de autoclavado, se sembró una alícuota en TSA a 30°C por 24 horas y se comprobó la ausencia del crecimiento. Adicionalmente, se calculó la concentración inicial del cultivo, el cual se encontraba entre 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> UFC/ml.

Para el conteo de bacterias se realizó una dilución de 10<sup>-4</sup> en solución salina del cultivo líquido de 24 horas tanto de las cepas aisladas y de las patógenas. De esta dilución se cogieron 10ul y se colocaron en una cámara de Neubauer y se observó en el microscopio óptico a 1000x con aceite de inmersión para realizar el conteo de los campos. La fórmula para el cálculo de la concentración final es el siguiente:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4}{\text{dilución}}$$

Para tener un cultivo sin estimulación, el precultivo de 24 horas de crecimiento de la bacteria activa fue agregado a 250 ml de caldo LB y se incubó por 24 horas a 30°C con agitación constante de 120 RPM.

Para obtener cultivo estimulado, el precultivo fue agregado a 1.5L litros de caldo LB, junto con el pellet de *E. coli* TI, mencionado previamente. Se incubó por 24 horas a 30°C con agitación constante de 120 RPM. Al finalizar el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar el cultivo (estimulado y no estimulado) a 10 000 RPM por 10 minutos a 4°C. Se verificaron la pureza y los controles de esterilidad mediante tinción Gram y crecimiento en TSA. El sobrenadante fue separado del pellet mediante centrifugación y ambos fueron usados para la posterior extracción de compuestos.

#### Extracción del contenido intracelular bacteriano

El pellet de cada cultivo (estimulado y sin estimular) fue resuspendido en metanol-agua 2:1, mantenido a 4°C y sometido a sonicación para la ruptura celular, por 10 segundos cada 10 minutos, durante 4 horas y con agitación en vortex. Luego se centrifugó a 5000RPM a 4°C por 30 minutos y la fase metanólica luego fue concentrada en rotavapor, pesado y almacenado hasta uso.

#### Extracción líquida-líquida del sobrenadante con acetato de etilo

Se colocaron en el embudo de decantación el sobrenadante (del cultivo estimulado y sin estimular) y acetato de etilo en proporción 1:1 (74). La fase de acetato de etilo fue concentrada en rotavapor, pesada y almacenada a 4°C hasta uso.

#### Extracción líquida-líquida con diclorometano y metanol

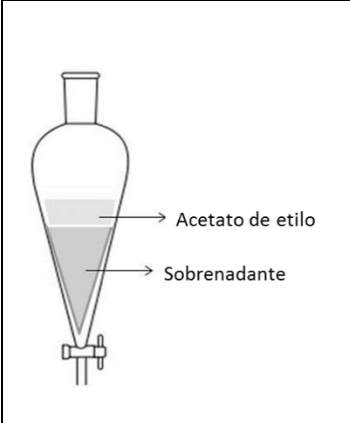
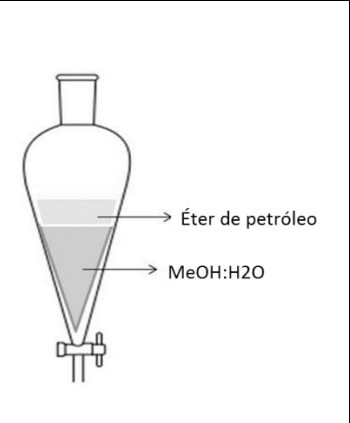
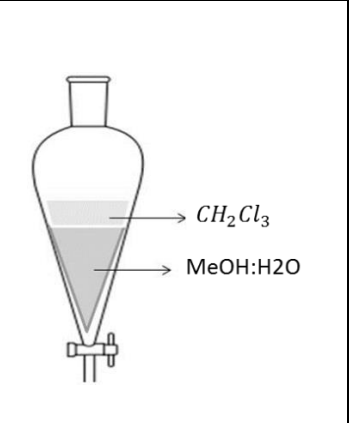
La fase acuosa de la extracción con acetato de etilo fue particionada con diclorometano-metanol en proporción 1:1 en un embudo de decantación. Las fases

de diclorometano fueron concentradas en rotavapor, pesadas y almacenadas a 4°C hasta uso.

#### Extracción líquida-líquida con éter de petróleo y metanol

La fracción de acetato de etilo fue particionada con éter de petróleo-metanol (metanol al 90% con agua destilada) en proporción 1:1 y ambas fases fueron evaporadas en rotavapor, pesadas y almacenadas a 4°C hasta proceder con los ensayos de actividad antimicrobiana.

Tabla 9. (A) Extracción con Acetato de etilo, (B) Extracción con Éter de petróleo – metanol y (C) Extracción con Diclorometano – metanol

(A)	(B)	(C)
		

#### Precipitación ácida y extracción con solvente del sobrenadante

El pH del sobrenadante del cultivo fue llevado a pH 2.0 con HCl 6N. Este fue colocado a 4°C durante 16 horas con agitación manual de manera regular. Luego de la incubación, el sobrenadante fue centrifugado a 20 000g a 4°C por 10 minutos. Se separó el sobrenadante y el precipitado fue disuelto con metanol durante 2 horas a 4°C. La fase metanólica fue luego concentrada en rotavapor,

pesada y almacenada a 4°C hasta proceder con los ensayos de actividad antimicrobiana.

### 3.2.9.1 Cromatografía en capa fina (TLC) de fracciones

Durante el proceso de fraccionamiento biodirigido se utilizó placas de TLC de silica gel 60 y de fase reversa RP-18 para analizar el perfil de compuestos presentes en los extractos o fracciones. Se aplicaron 5 uL de soluciones de 20mg/mL de los extractos o fracciones sobre la línea base de una placa (8cm largo x 3cm ancho) con una microjeringa. El revelado de las placas de TLC se hizo con una lámpara UV (254 nm y 365nm).

### 3.2.9.2 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción de acetato de etilo

#### Fraccionamiento con columnas SPE (solid phase extraction) C18

Se continuó con la separación a partir de las fracciones de acetato de etilo del sobrenadante, 1 (158mg) y 2 (190mg), utilizando para cada una la columna SP1 y SP2, respectivamente. Dichas columnas fueron eluidas con metanol antes de colocar las muestras. Los sistemas se muestran en la Tabla 10 y 11.

Tabla 10. Sistema de elución para SPE 1

<b>Fracción</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Proporción</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Volumen (ml)</b>
SPE1.1 (E025)	30,8	Agua	-	100% agua	2
		Acetonitrilo agua	1:4	25% ACN	2
SPE1.2	38.7	Acetonitrilo	1:1	50% ACN	2

(E5085)		agua			
		Acetonitrilo agua	1:1.2	85% ACN	2
SPE1.3	11.2	Acetonitrilo	-	100% ACN	2
E100M		Metanol	-		4

Tabla 11. Sistema de elución para SPE2

<b>Fracción</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Volumen (ml)</b>
SPE2.1 (FMeOH)	68	Metanol	100%	8
SPE2.2 (FH <sub>2</sub> O)	90	Agua	100%	8

Columna abierta con silica gel 60 fase normal para la fracción SPE1.2 (E5085)

En una pipeta pasteur de vidrio de 100mm de largo por 5mm de ancho, se colocó silica gel 60 (mitad de volumen), equilibrada con acetato de etilo. Se colocaron 22.2mg de la fracción SPE1.2 (E5085) y se eluyó primero con acetato de etilo (300µl) y luego con metanol (300µl).

Tabla 12. Sistema de elución para columna abierta con silica gel 60

<b>Fracción</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Porcentaje</b>
FacOEt	3.1	Acetato de etilo	100%

FMeOH	9.8	Metanol	100%
-------	-----	---------	------

### 3.2.10 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

#### Microdilución en caldo

Para probar la actividad antimicrobiana de los extractos se usó la metodología de microdilución en caldo en placa de 96 pozos (75,76) . Se usaron cultivos de 24 horas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13311 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a una concentración final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL y un volumen final de 100µl/pocillo, incluyendo el medio de cultivo caldo LB. Los extractos fueron disueltos en DMSO (concentración final menor al 1%). El control de tetraciclina se encontraba de 2µg/mL a  $2 \times 10^{-3}$  µg/mL.

Adicionalmente se evaluó la actividad del sobrenadante crudo. Luego de someter a las bacterias a los extractos y sobrenadante crudo, las placas fueron incubadas por 24 horas a 30°C. Luego de este período, se leyeron las absorbancias a 595nm en un lector de microplacas (iMark<sup>TM</sup> - Biorad).

#### Bioautografía

Esta metodología se usó de dos maneras: bioautografía directa por punto o “dot-blot” y bioautografía con corrida en TLC. Se probó la actividad contra las tres bacterias patógenas *E. coli* ATCC 25923, *S. enterica* ATCC 13311 y *S. aureus* MRSA ATCC 43300. Como revelador biológico, se utilizó el MTT (5mg/ml), el cual se agrega luego del crecimiento del microorganismo.

Para la bioautografía por punto (primera detección de la actividad) se prepararon placas de TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (fase normal) de 8 x 3cm. Los extractos se prepararon a la concentración de 20mg/ml y se sembraron 5µl conteniendo 100µg de la muestra en forma de punto en 2 repeticiones sobre la placa de TLC. Como control de observación de la actividad se preparó tetraciclina a 3mg/ml y se diluyó a la proporción 1:60 en metanol. De igual manera, se sembraron 5µl conteniendo 0.25µg de tetraciclina, en forma de punto. Se muestran los puntos naranjas donde se ha colocado muestra y/o tetraciclina en la Figura 12.

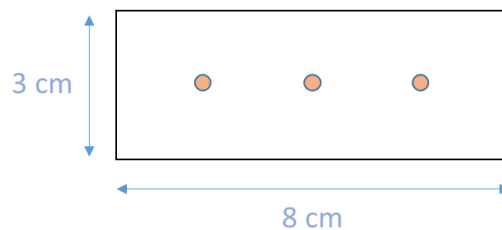


Figura 12. Sembrado de muestras sobre la placa de TLC para bioautografía por punto

Luego de la siembra, se colocaron las placas bajo UV durante 15 minutos en cabina para esterilizar, cada placa de TLC una en una placa Petri. Se preparó AN y se mantuvo a 60°C, luego de la esterilización por autoclave para evitar su solidificación hasta su uso. El inóculo bacteriano se preparó a partir de un cultivo fresco de 24 horas. Se realizó el conteo y cálculos para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml en el volumen de agar a usar. El AN fue inoculado y se dispensaron 5ml sobre la placa de TLC. Luego de la solidificación del medio

inoculado sobre la placa de TLC, estas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Terminado el tiempo de incubación, las placas fueron reveladas con MTT a 5mg/ml en PBS 1X. Se agregaron 200µl de la solución de MTT sobre la placa de TLC con agar y se incubó durante 2 a 3 horas o hasta observar coloración.

Para la bioautografía con corrida en TLC, las muestras fueron colocadas individualmente en una placa de 8x3cm en forma de punto como se muestra en la Figura 13.

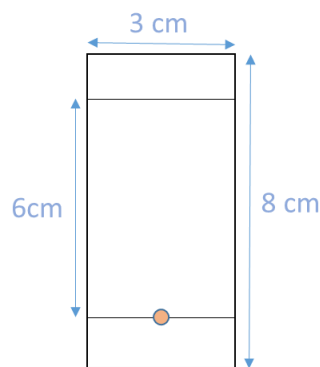


Figura 13. Sembrado de muestra sobre la placa de TLC para bioautografía con corrida.

Luego de la siembra, la TLC fue colocada en una cubeta conteniendo la fase móvil a usar y se dejó correr el sistema. Una vez terminada la corrida, se sacaron las placas con una pinza y se evaporó el solvente rápidamente con ayuda de aire caliente. Las placas fueron cuidadosamente colocadas en una placa Petri (sin proceso UV) y fueron inoculadas y reveladas de la misma manera descrita anteriormente. Para ambos casos de bioautografía se consideraron los siguientes controles:

**\*Control de crecimiento:** Placa de TLC que ha pasado por el proceso de solventes, que no contiene muestra de compuestos, pero si agar inoculado con bacteria.

**\*Control de esterilidad:** Placa de TLC que ha pasado por el proceso de solventes, que no contiene muestra de compuestos y agar no inoculado con bacterias.

### **3.2.11 Determinación de las moléculas bioactivas mediante espectrometría de masas.**

Las placas de TLC, conteniendo la fracción SPE2.1 (fracción metanólica) separada por la fase móvil cloroformo – metanol – agua (65:25:4) y activa contra *S. aureus*, fueron enviadas a la Universidad Toulouse III Paul Sabatier (Francia) para su análisis con el equipo de espectrometría de masas LTQ Orbitrap XL<sup>TM</sup> (Thermo Scientific) acoplado a un equipo de desorción (CAMAG), el cual permite la desorción de los compuestos activos del área en la TLC en la que se observó el halo de inhibición.

Se utilizó el programa MZmine 2 y las bases de datos Dictionary of Natural Products (DNP), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y Metabolite and Tandem MS Database (MetLin), para buscar una fórmula molecular e identificación más probable de la molécula activa.

Para obtener una fórmula molecular a partir del espectro obtenido por el equipo de masas se consideraron algunos parámetros que fueron modificados dentro del

programa MzMine 2, los cuales permitieron limitar el número de elementos químicos para seleccionar y reducir el número de posibles candidatos. Estos parámetros están incluidos dentro de las 7 reglas básicas que son necesarias tomar en cuenta para determinar la validez de dichas fórmulas químicas. La proporción “H/C” permite considerar que el valor de hidrógenos y carbonos sea ente 0.1 y 6. La condición “NOPS/C” considera si se obedece que  $N/C \leq 4$ ,  $O/C \leq 3$ ,  $P/C \leq 2$  y  $S/C \leq 3$ ; y la condición “multiple element counts” que restringe el número máximo de combinaciones de elementos, la cual obedece a leyes heurísticas propias del algoritmo. Se consideró el valor de “ring double band” o RDBE como valor de 0 a 40 (default), el cual estima el número de anillos y enlaces insaturados en la molécula; y también se consideró una tolerancia de m/z de 0.02 de diferencia entre lo obtenido con lo encontrado según el programa (77).

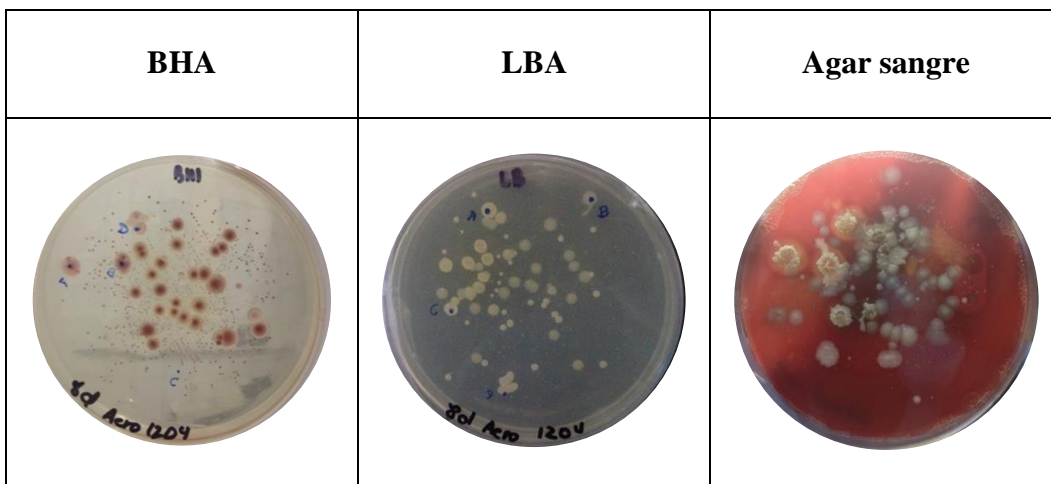
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal de la larva de *H. illucens*

En la Tabla 13 se muestra el aislamiento primario de las bacterias del tracto intestinal de *Hermetia illucens* luego de la incubación a 30°C por 24 horas, en los diferentes medios de cultivo utilizados. Las colonias de morfología diferente fueron consideradas como un morfotipo. Cada morfotipo fue luego repicado 3 veces mediante siembra por agotamiento en TSA para obtener cepas puras y cada una fue criopreservada a -70°C según la metodología de criopreservación indicada previamente.

Se obtuvieron 33 cepas aisladas y todas fueron sometidas a la extracción de ADN genómico para la amplificación y posterior secuenciamiento del ARN ribosomal 16S. La caracterización

Tabla 13. Cultivo del pool de bacterias del tracto intestinal en tres medios de cultivo diferente para aislamiento



## 4.2 Identificación molecular y caracterización enzimática de las cepas aisladas del tracto intestinal de la larva de *H. illucens*

Las cepas que resultaron tener actividad contra las bacterias patógenas ATCC fueron: BGS8\_4, BGS8\_5, BGS8\_6, BGS8\_7, BGS8\_8, BGS8\_9, BGS11\_18. Estas 7 cepas resultaron tener una secuencia del gen del ARN ribosomal 16s con 99% de identidad contra la secuencia del mismo gen de *Bacillus amyloliquefaciens*, según la base de datos del NCBI y se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Resumen de resultados de identificación molecular de bacterias aisladas

Código	Organismo	% Identidad	% Cobertura de secuencia	Longitud de secuencia (bp)	Código de acceso
BGS11_1	<i>Proteus mirabilis</i>	99	99	1504	NR_114419.1
BGS11_11	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1472	NR_074902.1
BGS11_12	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1476	NR_074902.1
BGS11_13	<i>Shigella flexneri</i>	99	99	1480	NR_026331.1
BGS11_14	<i>Shigella flexneri</i>	99	100	1477	NR_026331.1
BGS11_15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	100	1473	NR_117683.1
BGS11_16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	100	1473	NR_117683.1
BGS11_17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	99	1446	NR_117686.1
BGS11_18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	99	1484	NR_041455.1
BGS11_19	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	100	1307	NR_118996.1
BGS11_20	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	100	1480	NR_042337.1
BGS11_2	<i>Proteus mirabilis</i>	99	100	1413	NR_114419.1
BGS11_21	<i>Staphylococcus warneri</i>	99	99	1485	NR_025922.1
BGS11_22	<i>Paenibacillus cucumis</i>	98	98	1493	NR_149778.1
BGS11_23	<i>Lactobacillus pentosus</i>	100	99	1498	NR_029133.1
BGS11_3	<i>Proteus mirabilis</i>	100	100	1479	NR_114419.1
BGS11_4	<i>Proteus mirabilis</i>	100	100	1495	NR_114419.1
BGS11_5	<i>Proteus mirabilis</i>	99	100	1416	NR_114419.1
BGS11_6	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1472	NR_074902.1
BGS11_7	<i>Providencia rettgeri</i>	99	99	1478	NR_115880.1
BGS11_8	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1489	NR_074902.1
BGS11_9	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1416	NR_074902.1
BGS11_10	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	100	1487	NR_074902.1
BGS8_1	<i>Proteus mirabilis</i>	99	100	1480	NR_114419.1
BGS8_10	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	100	1480	NR_118996.1
BGS8_2	<i>Proteus mirabilis</i>	100	100	1480	NR_114419.1
BGS8_3	<i>Providencia rettgeri</i>	99	100	1476	NR_115880.1
BGS8_4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	100	1484	NR_075005.1
BGS8_5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	99	1422	NR_075005.1
BGS8_6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	100	1482	NR_075005.1
BGS8_7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	100	1483	NR_075005.1
BGS8_8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	100	1483	NR_075005.1
BGS8_9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	100	1482	NR_075005.1

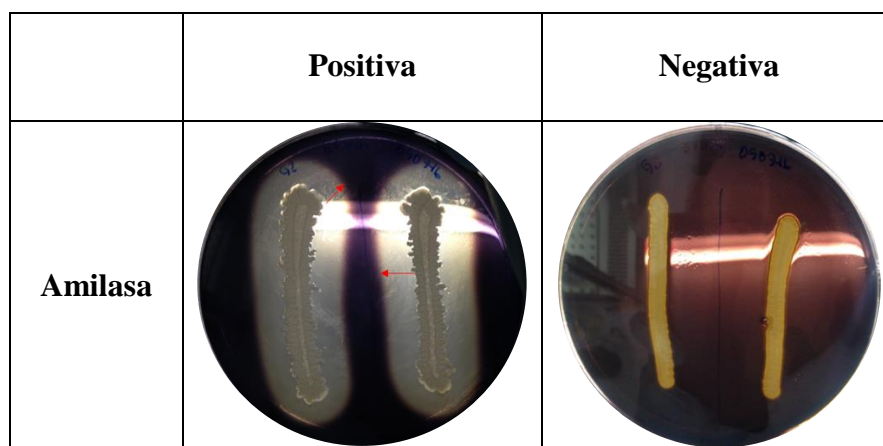
En total se obtuvieron 33 cepas pertenecientes a 9 géneros bacterianos y 2 filo, Firmicutes y Proteobacteria (Tabla 15). De las 33 cepas, se han encontrado 11 especies diferentes, lo cual indica que algunas cepas comparten un porcentaje similar de identidad de la secuencia del ARN ribosomal 16s contra la misma especie obtenida según la base de datos del NCBI.







Tabla 15. Clasificación taxonómica de las cepas aisladas de la larva

Filo	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
			Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>
				<i>Shigella</i>
				<i>Klebsiella</i>
				<i>Providencia</i>
				<i>Proteus</i>

En la Tabla 16 se muestran placas representativas de cada prueba que resultaron positivas y negativas para amilasa, celulasa y proteasa. Para la prueba de lipasa se muestra la coloración del control positivo y un control negativo (medio lipasa sin inocular).

Tabla 16. Resultados positivos y negativos de pruebas enzimáticas



<b>Celulasa</b>		
<b>Proteasa</b>		
<b>Lipasa</b>		

Los resultados obtenidos de las pruebas enzimáticas muestran 8 cepas diferentes, lo cual indica que algunas cepas poseen el mismo perfil de actividad contra estas 7 pruebas enzimáticas (Tabla 17).

Tabla 17. Resumen de resultados de caracterización enzimática y actividad contra patógenas

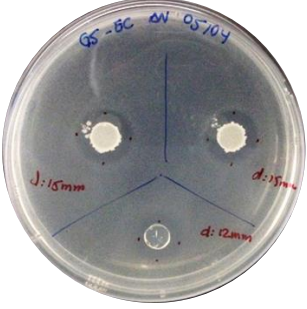
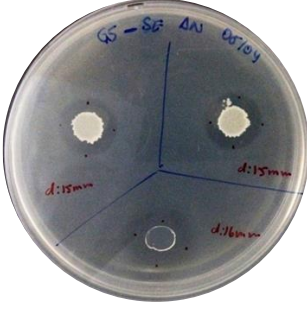
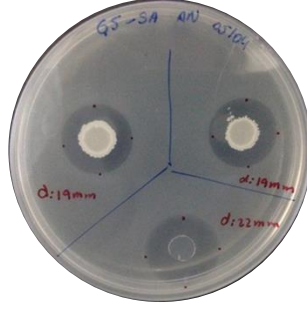
Código	Gram	Catalasa	Oxidasa	Ureasa	Amilasa	Celulasa	Lipasa	Proteasa	Especie
BGS11_1	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS11_11	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS11_12	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS11_13	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella flexneri</i>
BGS11_14	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella flexneri</i>
BGS11_15	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BGS11_16	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BGS11_17	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BGS11_18	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS11_2	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS11_3	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS11_4	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS11_5	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS11_6	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS11_7	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Providencia rettgeri</i>
BGS11_8	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS11_9	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS11_10	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia fergusonii</i>
BGS8_1	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS8_10	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
BGS8_2	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Proteus mirabilis</i>
BGS8_3	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Providencia rettgeri</i>
BGS8_4	+	+	-	-	+	+	+	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS8_5	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS8_6	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS8_7	+	+	-	-	+	-	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS8_8	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BGS8_9	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

### 4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas contra las cepas patógenas ATCC

#### Enfrentamiento por bloques de agar o Agar slab

En la Tabla 18 se muestran algunas imágenes del enfrentamiento que presentaron un halo de inhibición de las cepas patógenas. Los bloques superiores (blancos) de la placa de Agar Nutritivo contienen a la bacteria activa y el bloque de la parte inferior (transparente), a la tetraciclina.

Tabla 18. Enfrentamiento de *Bacillus sp.* (BGS8\_5) contra bacterias patógenas

<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus MRSA</i>
		
Halo de inhibición <i>Bacillus sp.</i> : 15mm Tetraciclina: 12mm	Halo de inhibición <i>Bacillus sp.</i> : 15mm Tetraciclina: 16mm	Halo de inhibición <i>Bacillus sp.</i> : 19mm Tetraciclina: 22mm

#### 4.4 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del aislamiento biodirigido contra las cepas patógenas ATCC

##### 4.4.1 Evaluación de la actividad de sobrenadante y extractos crudos mediante microdilución

Se evaluó la actividad del sobrenadante de los cultivos estimulado y no estimulado de la bacteria activa seleccionada (BGS8\_5) contra las 3 bacterias patógenas usando la metodología de microdilución en caldo. Se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento con respecto al control a través de la medición de la absorbancia. Cabe mencionar que el sobrenadante del cultivo no

fue cuantificado al no haber sido liofilizado por lo que el porcentaje del sobrenadante directamente obtenido de cultivo fue diluido 1:2 de manera seriada en caldo Luria Bertani para la prueba de microdilución en caldo.

Figura 14. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por el sobrenadante

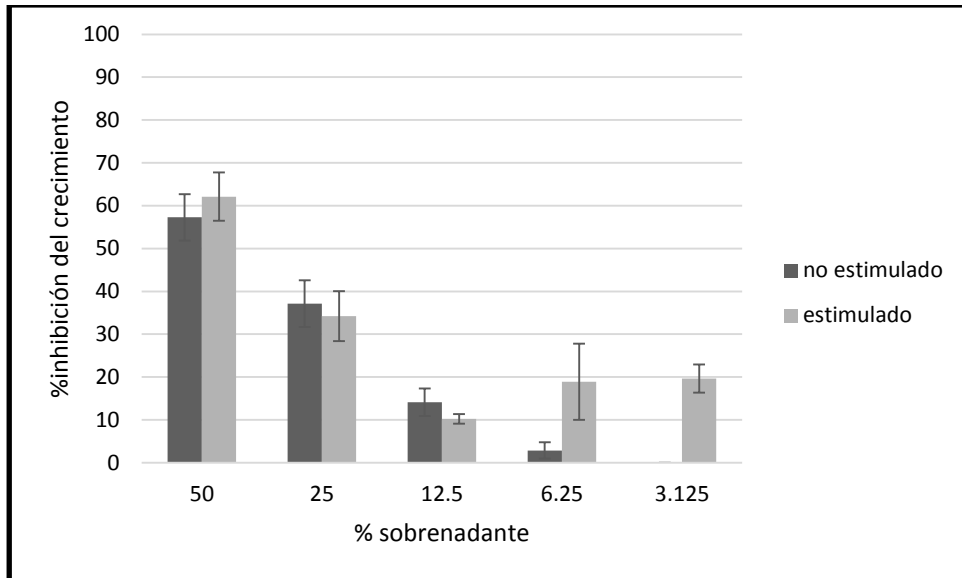


Figura 15. Inhibición del crecimiento de *E. coli* frente por el sobrenadante

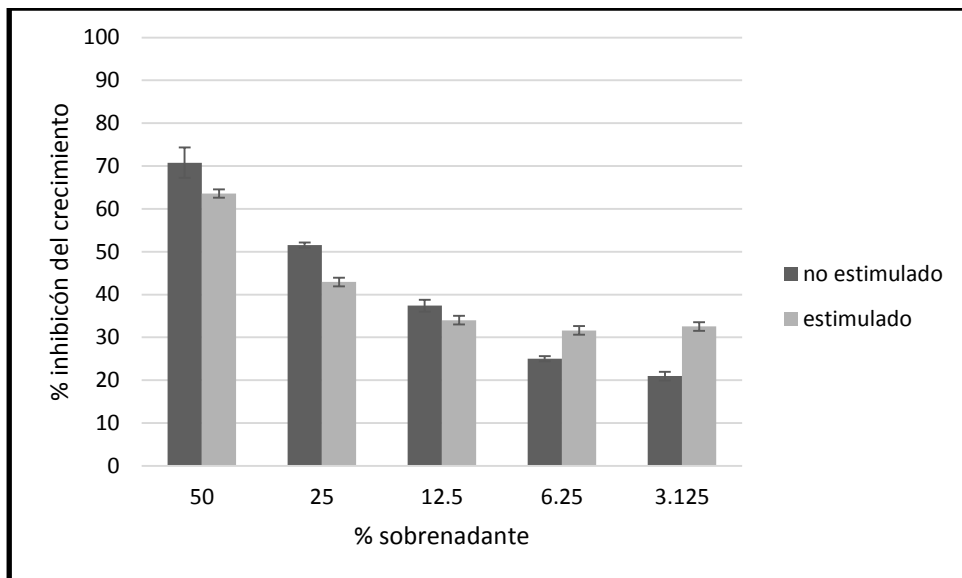
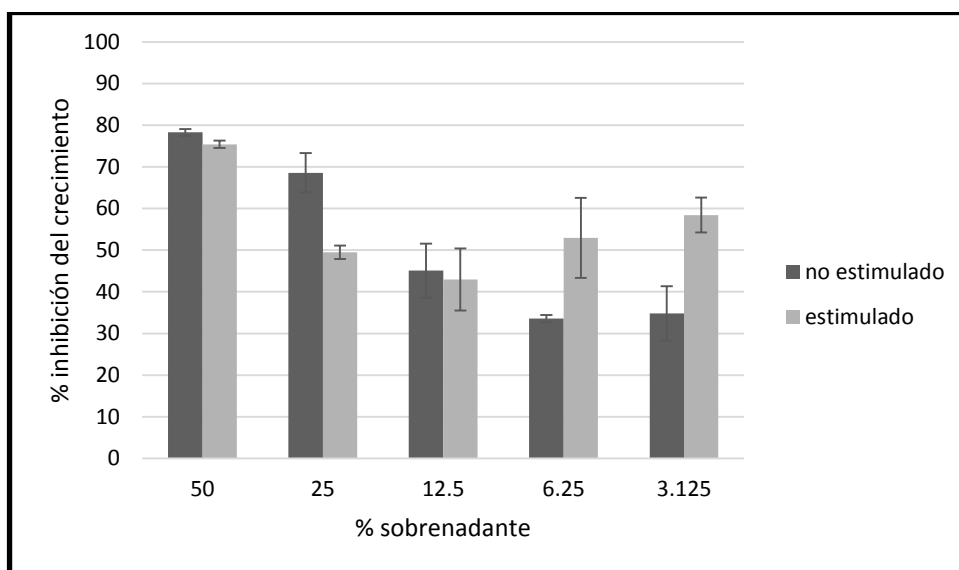


Figura 16. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por el sobrenadante



El sobrenadante inhibió el crecimiento de *E. coli* y *S. enterica* entre un 60 – 70% con respecto al control de crecimiento de cada bacteria, mientras que para *S. aureus* la inhibición fue mayor al 70%. No se observaron diferencias entre el cultivo estimulado y no estimulado.

Se evaluó también la actividad de los extractos: pellet, precipitación ácida del sobrenadante (PP), fracción de acetato de etilo del sobrenadante (AcOEt) y fracción de diclorometano (DCM) de los cultivos estimulado y no estimulado de la bacteria activa seleccionada (BGS8\_5) a las concentraciones de 2, 1, 05 y 0.25 mg/ml disueltas en DMSO. Se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento con respecto al control a través de la medición de su absorbancia.

Figura 17. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo sin estimular

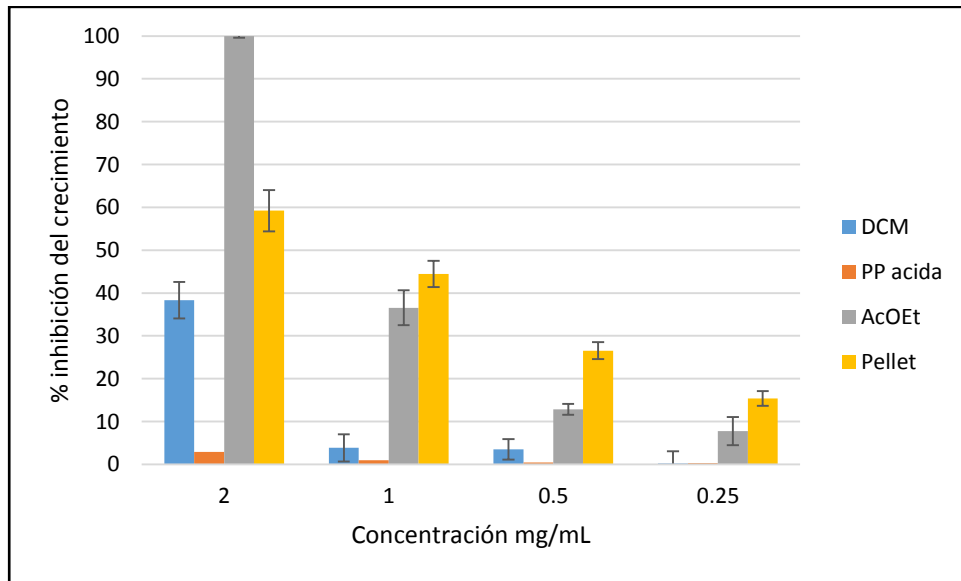


Figura 18. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado

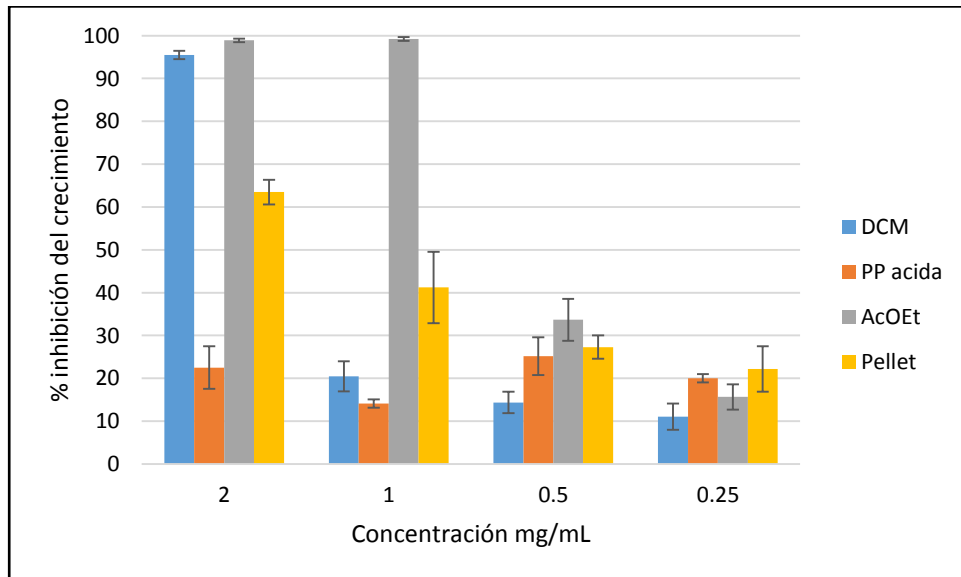


Figura 19. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo sin estimular

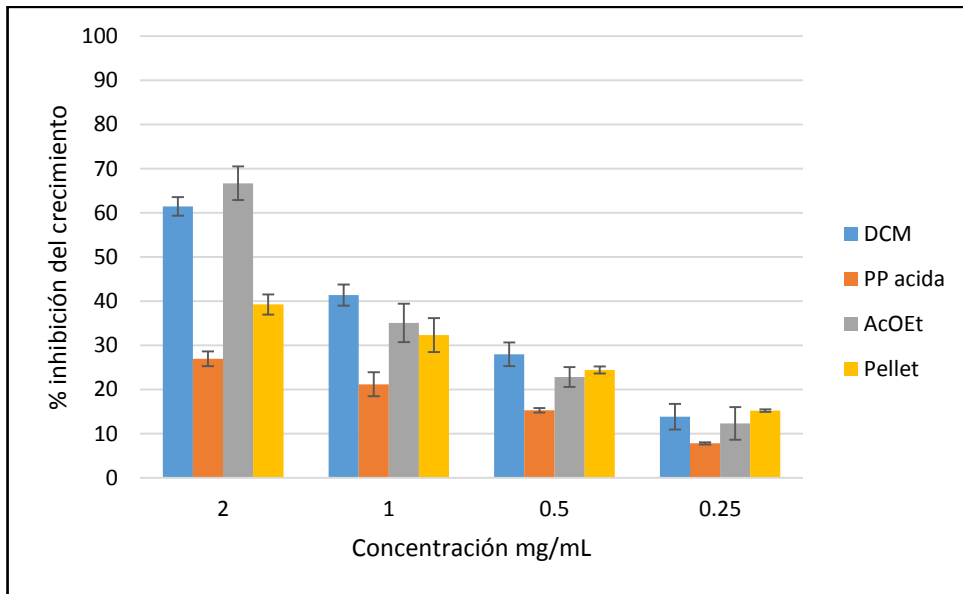


Figura 20. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo estimulado

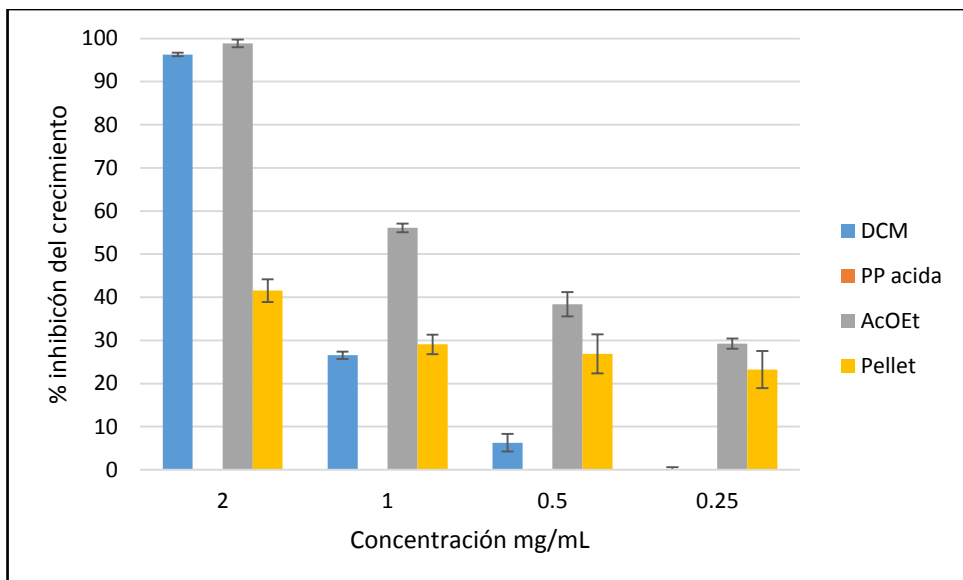


Figura 21. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por los extractos del cultivo sin estimular

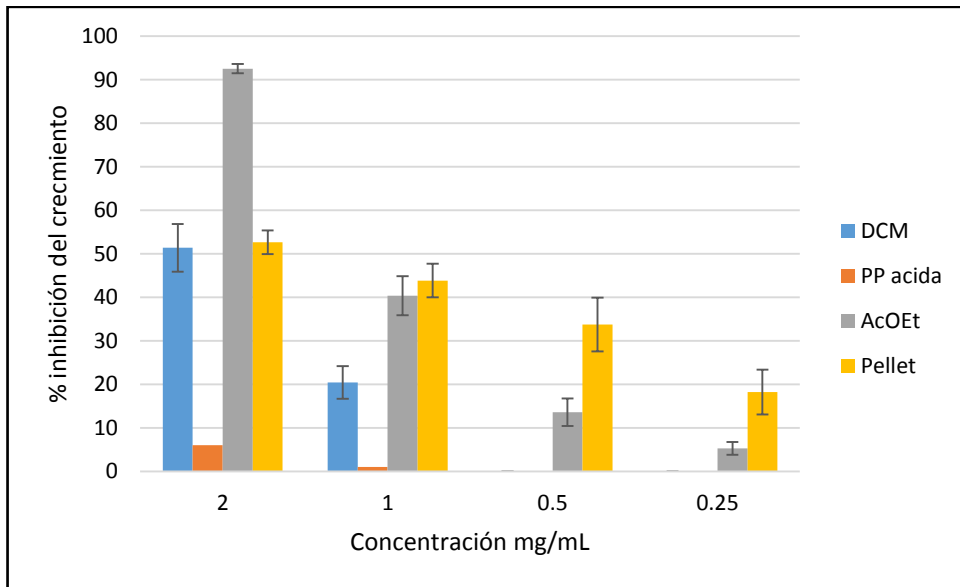
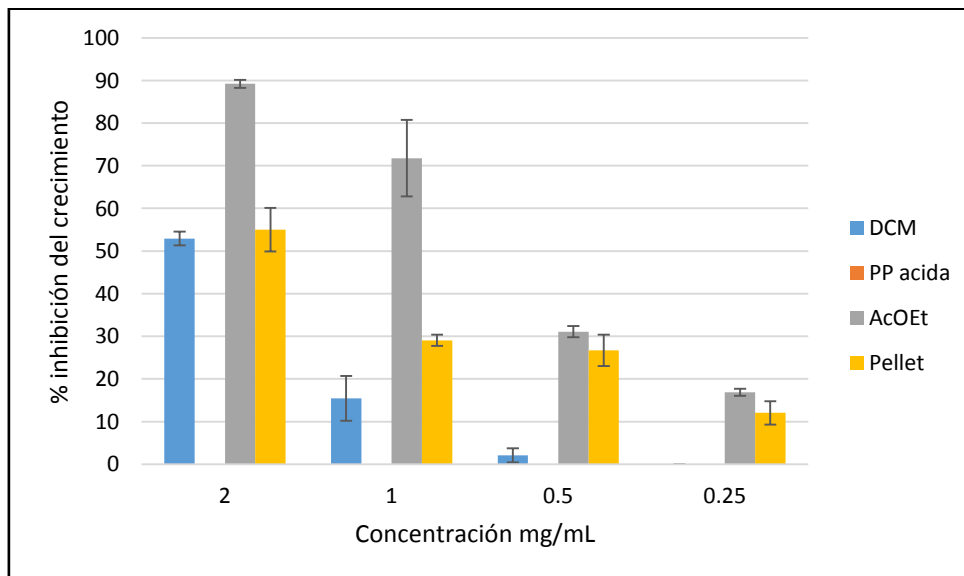


Figura 22. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por los extractos del cultivo estimulado



Los porcentajes de inhibición de crecimiento más altos fueron dados por la fracción de acetato de etilo y por la fracción de diclorometano, tanto para los obtenidos a partir del cultivo sin estimular como del estimulado, en comparación con el extracto del pellet y el del precipitado ácido del sobrenadante. En la Tabla 19 se resumen los porcentajes de inhibición a la concentración más alta probada de 2 mg/ml de cada extracto obtenido para cada bacteria patógena.

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de extractos a 2mg/mL frente a *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*

%	Cultivo estimulado				Cultivo sin estimular			
	AcOEt	DCM	Pellet	PP	AcOEt	DCM	Pellet	PP
<i>EC</i>	<b>99</b>	96	42	0	<b>67</b>	61	39	27
<i>SE</i>	<b>99</b>	95	63	23	<b>99</b>	38	59	3
<i>SA</i>	<b>90</b>	53	55	0	<b>93</b>	51	53	6

En base a estos resultados se decidió trabajar principalmente con la fracción de acetato de etilo del sobrenadante, para lo cual se prepararon nuevos cultivos de la bacteria activa seleccionada, estimulada con *E. coli* térmicamente inactivada. A partir del nuevo cultivo, la fracción de acetato de etilo y el extracto del pellet fueron evaluados para corroborar la actividad antimicrobiana frente a las cepas patógenas, mediante microdilución en caldo. El valor de la mínima concentración inhibitoria (MIC) obtenido para la fracción de acetato de etilo fue de 1 mg/mL para *E. coli*, *S. entérica* y *S. aureus*.

Figura 23. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado

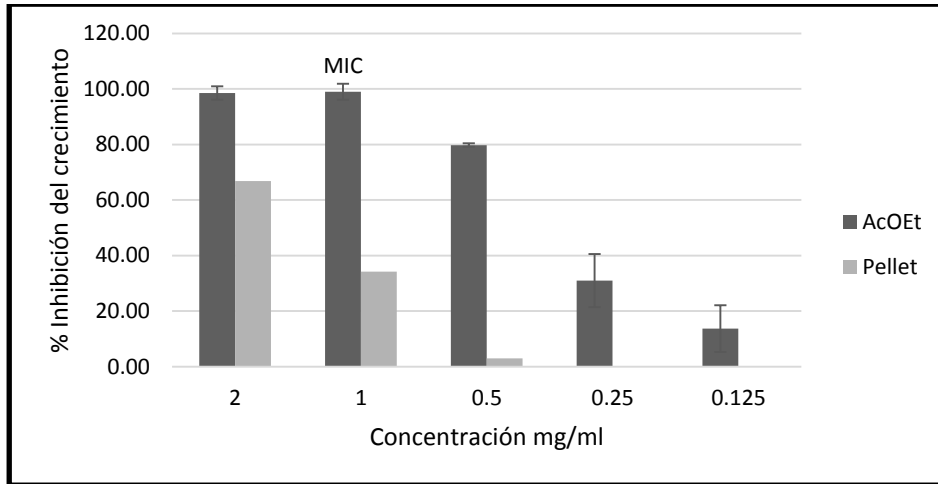


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por los extractos del cultivo estimulado

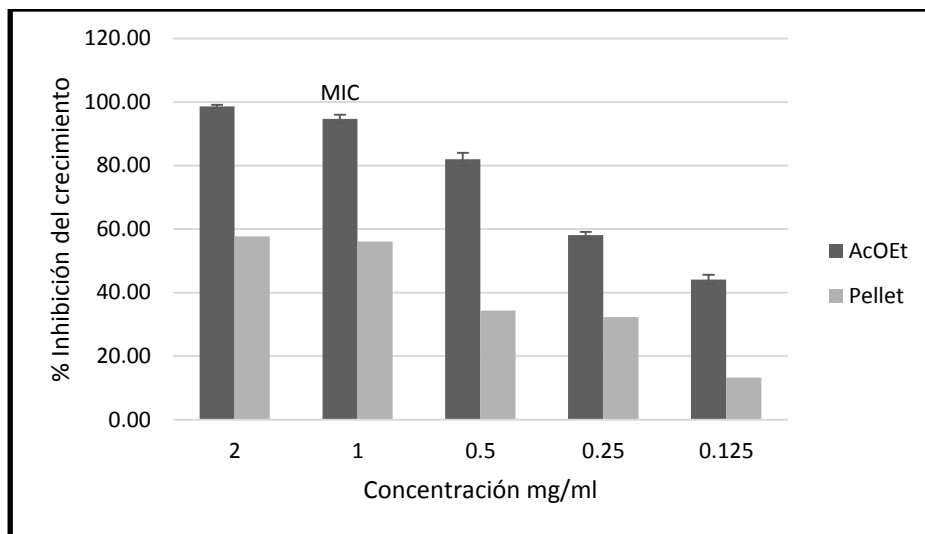
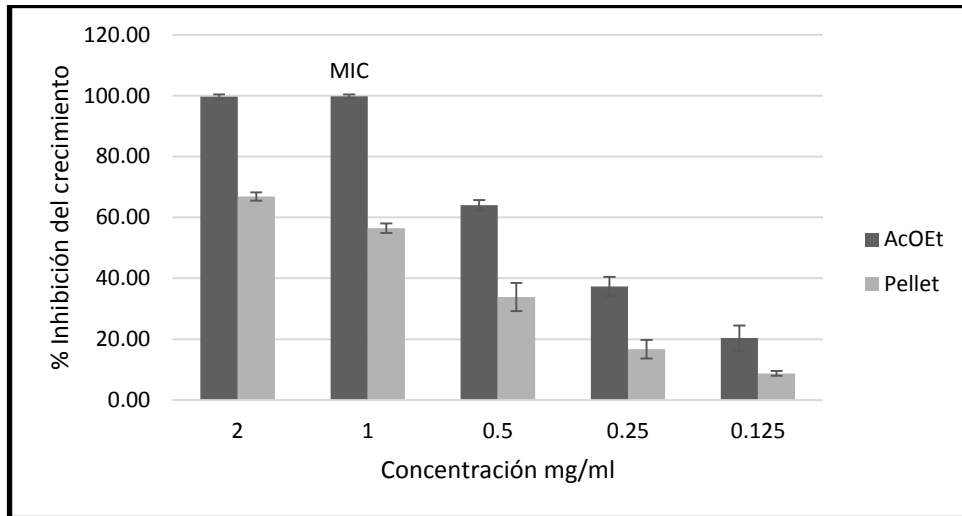


Figura 25. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por los extractos del cultivo estimulado



#### 4.4.2 Evaluación de la actividad mediante bioautografía de la fracción activa (Fracción de acetato de etilo)

La metodología de bioautografía permitió observar la actividad de la fracción de acetato de etilo de manera cualitativa frente a las cepas patógenas. Se colocaron 3 cantidades diferentes de este extracto (25, 50 y 100µg) sobre la placa de TLC (Tabla 20).

Tabla 20. Bioautografía por punto de la fracción de acetato de etilo

<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<p>100µg</p>	<p>100µg</p>	<p>100µg</p>
<p>50µg</p>	<p>50µg</p>	<p>50µg</p>
<p>25µg</p>	<p>25µg</p>	<p>25µg</p>

#### 4.4.3 Evaluación de la actividad de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción de acetato de etilo

##### Fraccionamiento con columna SPE C18.

De la columna SPE1 se obtuvieron las fracciones SPE1.1, SPE1.2 y SPE1.3, obtenidas a partir de la fracción de acetato de etilo. La fracción SPE1.2 presentó actividad contra las tres cepas patógenas detectado por microdilución, con un valor de MIC de 1 mg/ml para *E. coli* y 0.5 mg/ml para *S. enterica* y *S. aureus*.

Figura 26. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por la fracción SPE1.2

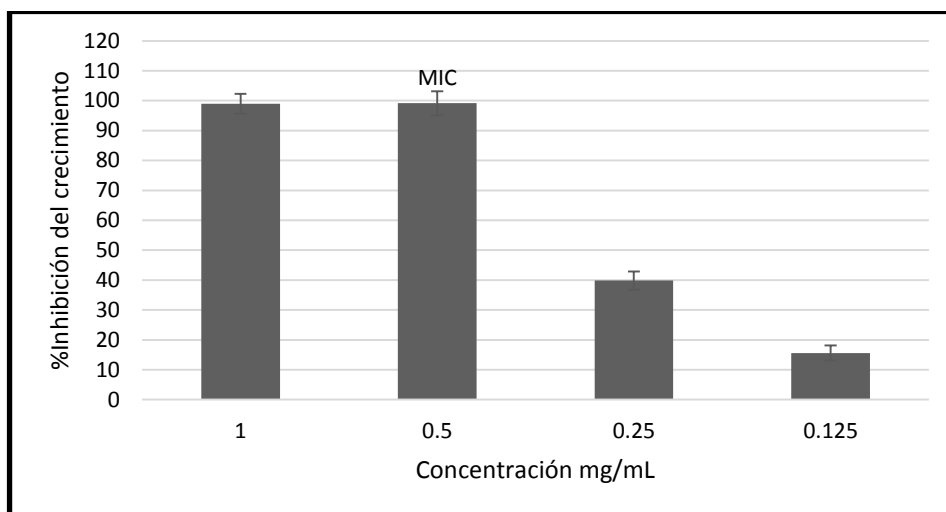


Figura 27. Inhibición del crecimiento de *E.coli* por la fracción SPE1.2

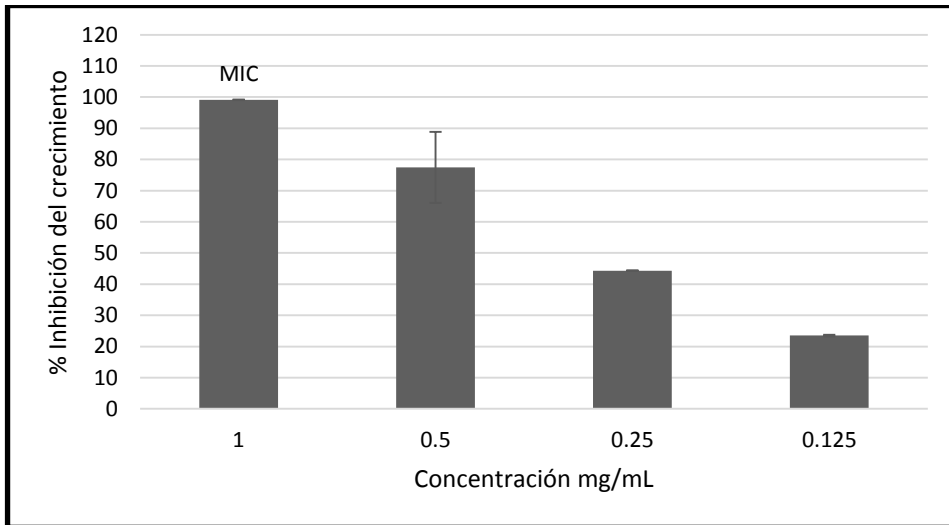
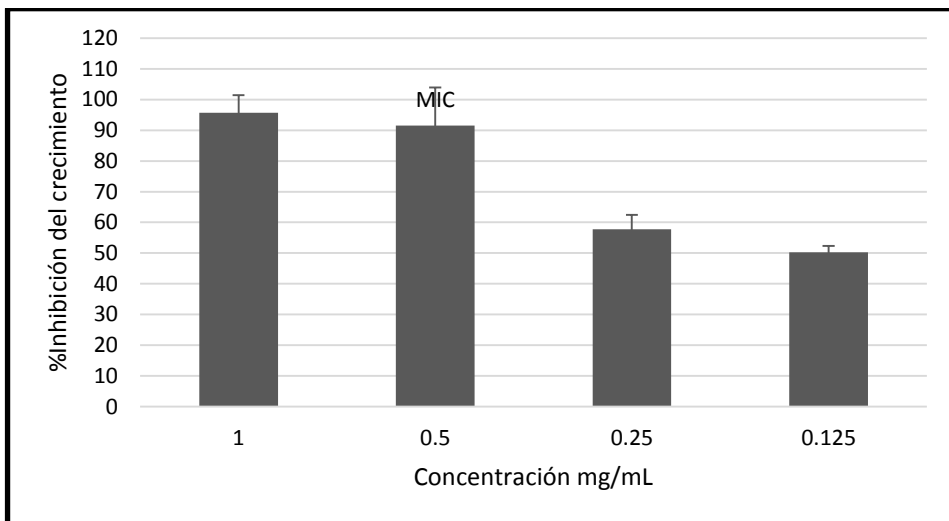


Figura 28. Inhibición del crecimiento de *S.aureus* por la fracción SPE1.2



Columna abierta con silica gel 60 fase normal para la fracción SPE1.2 (E5085)

La fracción SPE1.2 fue separada a través de una columna abierta con silica 60. Se obtuvieron dos fracciones, una fracción de acetato de etilo y otra fracción de metanol. Se verificó la actividad mediante microdilución, obteniéndose un MIC

de 1 mg/ml para de la fracción de acetato de etilo contra *S. aureus* y por otro lado, un MIC de 1mg/ml de la fracción metanólica contra *S. enterica* y *E. coli*.

Figura 29. Inhibición del crecimiento de *S. enterica* por las fracciones

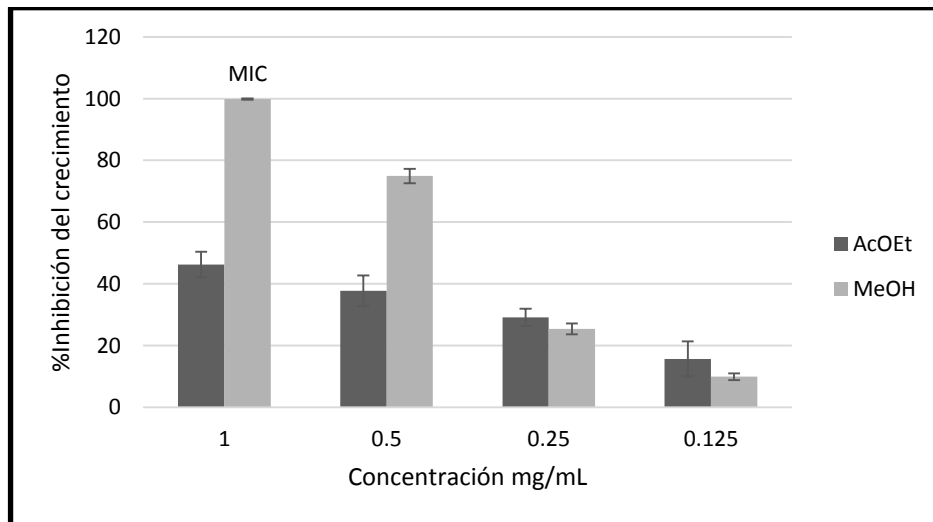


Figura 30. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por las fracciones

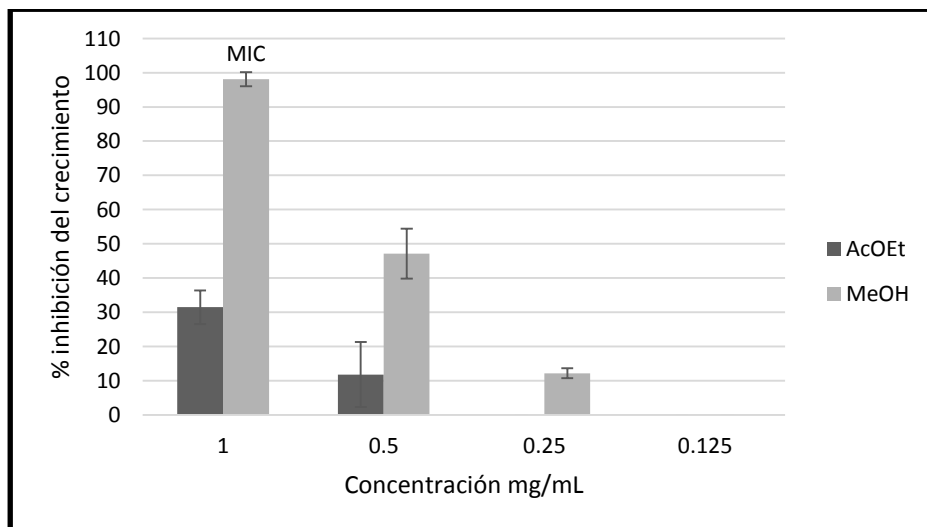
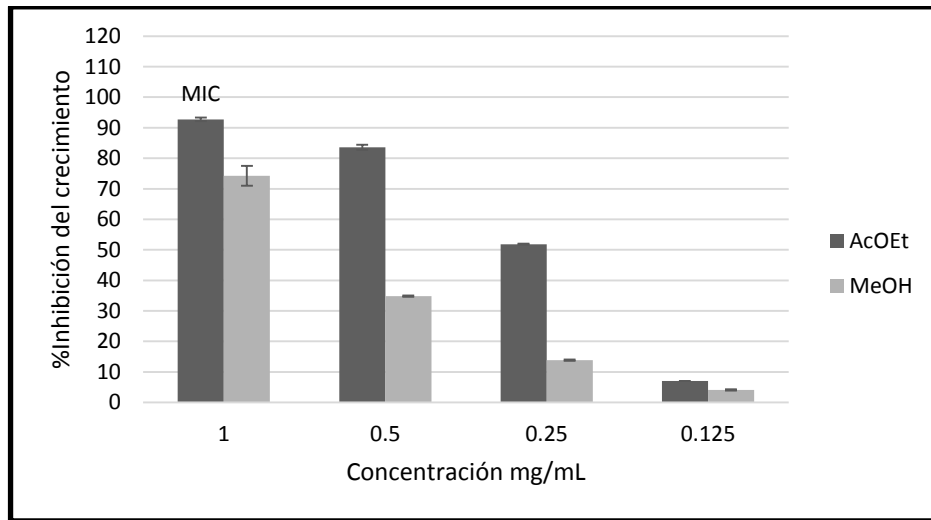


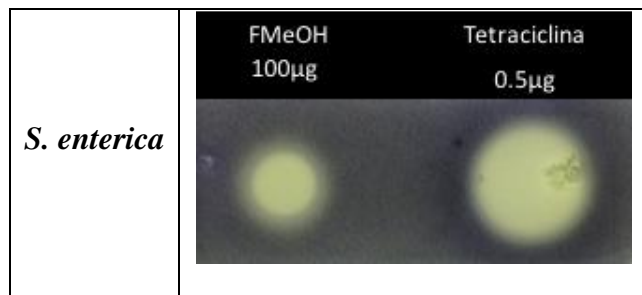
Figura 31. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por las fracciones







Fraccionamiento con columnas SPE (solid phase extraction) C18

La fracción de acetato de etilo fue separada también a través de la columna SPE2. Se obtuvieron dos fracciones, SPE2.1 (fracción metanólica) y SPE2.2 (fracción acuosa). La actividad de estas fracciones fue evaluada mediante bioautografía por punto y con corrida en TLC. La fracción SPE2.1 presentó un halo de inhibición contra las tres cepas patógenas mientras que la fracción acuosa no presentó halo de inhibición. La tetraciclina en este caso fue colocada a 0.5 µg.

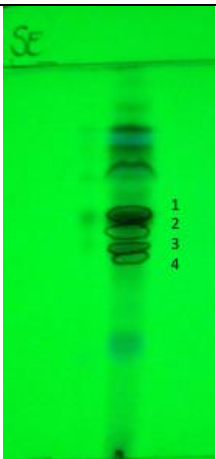

Tabla 21. Bioautografía por punto de la fracción metanólica (SPE2.1)



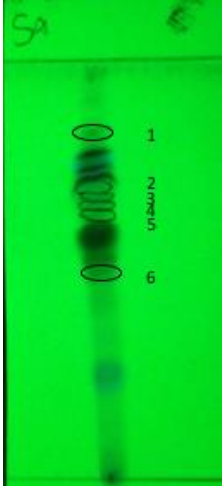



<i>E. coli</i>	FMeOH 100µg	Tetraciclina 0.5µg
		
<i>S. aureus</i>	FMeOH 100µg	Tetraciclina 0.5µg
		

La fase móvil para la corrida de la fracción metanólica (SPE2.1) en TLC fue cloroformo – metanol – agua 6.5 : 2.5 : 0.4. En la bioautografía de estas placas de TLC se identificaron las zonas de manchas que contienen al compuesto o compuestos activos de la fracción metanólica contra las tres cepas patógenas evaluadas. Estas placas de TLC (sin revelado) fueron enviadas a Francia para el análisis de las manchas señaladas.

Tabla 22. Bioautografía con corrida de TLC de la fracción metanólica (SPE2.1)

<i>S. enterica</i>		

<i>E. coli</i>		
<i>S. aureus</i>		

#### 4.5 Detección y caracterización de metabolitos secundarios mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Las manchas analizadas por el equipo de espectrometría de masas fueron las 2, 3, 4 y 5 de la TLC corrida con la fracción metanólica (SPE2.1) activa contra *S. aureus* (Tabla 20). El pico de mayor intensidad es de 1058.6786 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto más el aducto del elemento sodio. Según el programa MZmine 2 y las bases de datos Dictionary of Natural Products (DNP versión 25:1), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y

Metabolite and Tandem MS Database (MetLin) se encontró un compuesto con la fórmula molecular  $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$  con una diferencia de +0.0064 Da en masa con respecto a la obtenida en la placa de TLC.

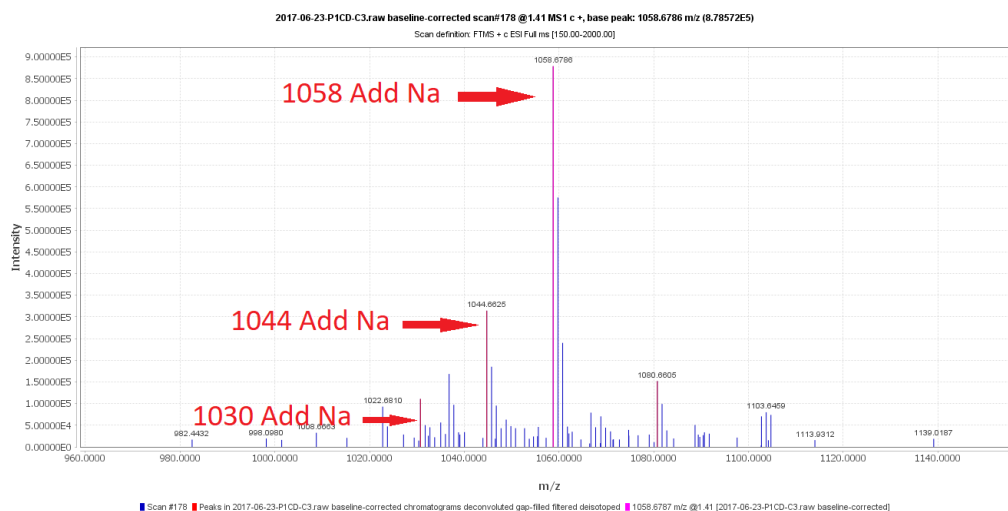


Figura 32. Espectro de masas obtenido a partir de la corrida en TLC de la fracción metanólica (SPE2.1) contra *S. aureus*

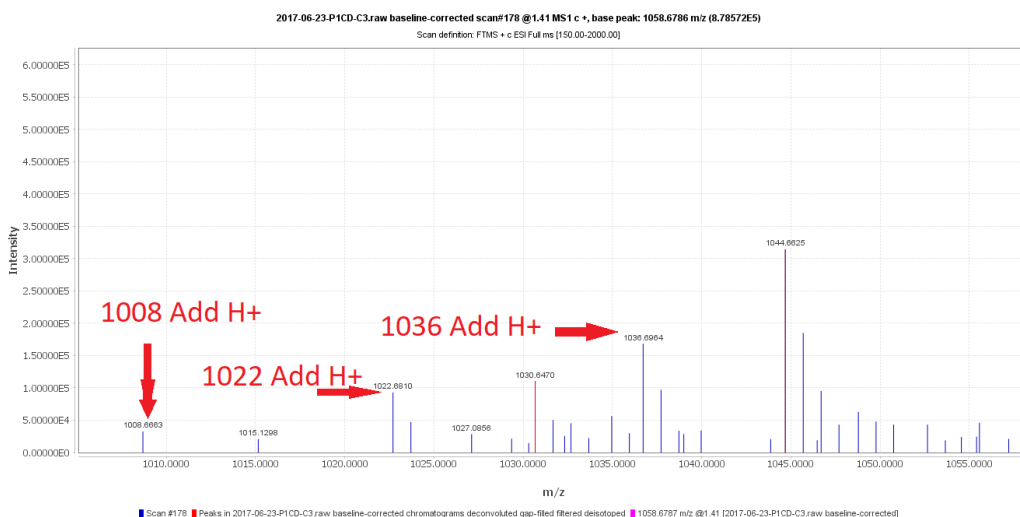


Figura 33. Espectro de masas obtenido a partir de la corrida en TLC de la fracción metanólica (SPE2.1) contra *S. aureus*

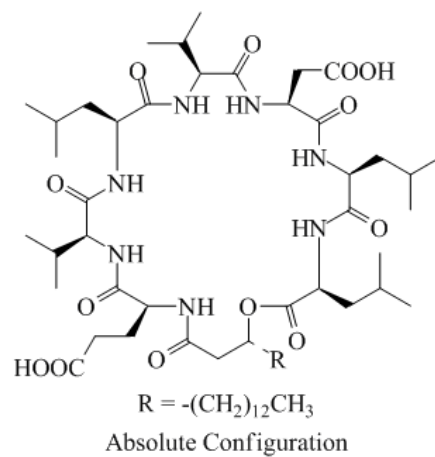


Figura 34. Estructura de la surfactina según la base de datos DNP con masa exacta de 1035.683138 (Romano, 2013)

## V. DISCUSIÓN

El tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens* alberga una gran diversidad de microorganismos que aún no han sido cultivados o estudiados pero que han podido ser detectados por técnicas de secuenciamiento metagenómico del gen del ARN ribosomal 16S. En el caso de la investigación realizada por Jeon y colaboradores (24) se pudo encontrar que las bacterias presentes en el intestino de la larva de esta mosca pertenecían principalmente a 4 filum: Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, considerando diferentes tipos de dietas. Esto corresponde a lo encontrado por Zheng y colaboradores (66) ya que los filum Bacteroidetes y Proteobacteria son los más dominantes incluso en los diferentes estadios del ciclo biológico de *H. illucens*. Además, es importante mencionar que la dieta que favorece una comunidad bacteriana más diversa es la de desechos orgánicos (24) y que estas comunidades son únicas comparadas con las de otros insectos, como la de las termitas (78,79) o polillas (80), las cuales han sido bastante estudiadas.

En el presente trabajo, las larvas fueron alimentadas con alimento estándar, procesado y balanceado, el cual puede poseer una menor complejidad de nutrientes que los desechos orgánicos, lo que a su vez podría conllevar a una menor diversidad bacteriana presente en el tracto digestivo de las larvas. Sin embargo, el estadio larval es uno de los estadios del ciclo biológico de *H. illucens* que mayor diversidad tiene a nivel de género (66). En un estudio de investigadores coreanos hallaron que el 98% de la diversidad bacteriana de todo el

tracto intestinal se encontraba ubicada en la porción del intestino posterior de la larva de *H. illucens* (81). Sin embargo, en el presente trabajo se hizo uso de toda la porción intestinal, tal como lo realizó Jeon y colaboradores (Figura 4) (24).

Cada una de las 33 cepas cultivadas en este trabajo fue aislada, dependiendo de su morfotipo, para luego ser identificadas molecularmente. Mediante el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S, contra la base de datos del NCBI, se obtuvieron 11 especies diferentes, cada secuencia con más del 99% de identidad (Tabla 15) contra la especie identificada. De las bacterias que fueron cultivadas e identificadas, 6 especies pertenecen al filum Firmicutes y 5 bacterias, al filum Proteobacteria. Se calcula que, de toda la diversidad microbiana existente en el planeta, menos del 1% han podido ser recuperadas a través de métodos de cultivo estándares en condiciones de laboratorio (82,83). Si bien se hizo uso de toda la porción intestinal de la larva, se usaron medios de cultivo nutritivos generales para el aislamiento y crecimiento de las bacterias (Tabla 12).

Diversos estudios han intentado variar algunas de las condiciones de cultivo y algunos de ellos con éxito, como usar fuentes no tradicionales de nutrientes, agregar moléculas de señalización o inhibidores de ciertos microorganismos no deseados, implementar periodos largos de incubación, incluso realizados en el mismo ambiente natural (84–87). Sin embargo, cada especie puede tener un requerimiento diferente de cualquiera de los parámetros que puedan afectar su crecimiento, por lo que resulta complicado considerar a todos ellos para lograr el

crecimiento de la mayoría de especies bacterianas de la microbiota intestinal u otro ambiente.

En base a todo lo previamente mencionado, las técnicas de recuperación de bacterias y el posterior aislamiento y cultivo de cada cepa en medios tradicionales son los que han generado, en este trabajo, la obtención de bacterias de fácil y rápido crecimiento. Como consecuencia, las especies identificadas son especies conocidas y algunas de ellas, con incluso algunos estudios sobre compuestos activos antimicrobianos. Cabe mencionar que un grupo de investigadores coreanos, lograron aislar y cultivar dos especies nuevas de bacterias aisladas del tracto intestinal de la larva de *H. illucens*, las cuales pertenecen a géneros bacterianos muy poco estudiados (67,68).

Sobre las cepas identificadas con reportes previos de actividad antimicrobiana, 12 de 33 cepas corresponden a los siguientes géneros: *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Paenibacillus* (Tabla 15). Las bacterias del género *Lactobacillus*, son conocidas por su producción de ácidos (ácido láctico y ácido acético) y su utilización para la preservación de alimentos, así como por la producción de bacteriocinas y enzimas con actividad antimicrobiana (88–91). Por otro lado, las bacterias del género *Paenibacillus* también se caracterizan por la secreción de enzimas, polisacáridos, aminoácidos y metabolitos secundarios que poseen actividad antibiótica (92,93). Sin embargo, en este trabajo las cepas aisladas del tracto intestinal pertenecientes a estos 2 géneros no presentaron actividad contra las 3 cepas patógenas utilizadas

mediante la metodología de bloques de agar o *agar slab*, aplicada para la detección de la actividad antibacteriana.

Si bien es cierto que no todas las cepas bacterianas son productoras de moléculas antibióticas, los hallazgos realizados mediante programas de secuenciamiento genómico han demostrado que el potencial genético de los microorganismos (diversidad de vías biosintéticas inhibidas que producen diversidad de compuestos) es mayor a lo que se conoce hasta ahora ya que ciertos genes no son transcritos bajo condiciones de laboratorio o los niveles de transcripción son muy bajos. Como consecuencia, sólo una fracción de la diversidad de microorganismos que producen compuestos, es obtenida (94–96).

Existen algunos trabajos que han tenido el objetivo de desarrollar nuevas metodologías que activen dichas rutas biosintéticas, como la sobreexpresión de algunos factores de transcripción (94) o la adición de inhibidores enzimáticos a los medios de cultivo que inhiban ciertas rutas biosintéticas para activar la producción de metabolitos secundarios (97). Adicionalmente a estas y otras metodologías, se encuentra la metodología de co-cultivo, la cual aprovecha las interacciones entre microorganismos que ocurren constantemente de manera natural en el medio ambiente (98).

El co-cultivo básicamente es un sistema que permite el crecimiento de dos o más poblaciones con cierto grado de contacto ya sea en medio líquido o sólido. Esta metodología ha sido usada por otras investigaciones para: (i) estudiar las

interacciones que existen entre diferentes poblaciones celulares, (ii) mejorar el éxito del cultivo de ciertos microorganismos, (iii) establecer interacciones sintéticas o (iv) para explotar las interacciones que resulten en la biosíntesis de productos naturales (18,99). En un estudio co-cultivaron dos hongos (*Trichophyton rubrum* y *Bionectria ochroleuca*) y descubrieron 5 compuestos producidos *de novo* en comparación con los compuestos encontrados en los cultivos puros (18). En otra investigación, cocultivaron un hongo (*Aspergillus fumigatus*) y una bacteria (*Streptomyces peucetius*) y encontraron 2 nuevos metabolitos antes no descritos (100).

La larva de *H. illucens* al consumir materia orgánica en descomposición consume también bacterias patógenas que están en constante interacción con las bacterias que viven en su tracto intestinal. El co-cultivo fue usado en este trabajo mediante los bloques de agar (*agar slab*) para enfrentar las bacterias aisladas del tracto intestinal contra las bacterias patógenas (ATCC) en condiciones de laboratorio. De las 10 cepas del género *Bacillus* encontradas en este trabajo, 7 cepas presentaron actividad contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13311 y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Tabla 16).

Las secuencias de nucleótidos del gen del ARN ribosomal 16S de estas 7 cepas activas tienen más del 99% de identidad con la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, según la herramienta BLAST de NCBI. Tanto el género *Bacillus* (66) como la especie *B. amyloliquefaciens* han sido previamente

reportados presentes en el tracto intestinal de la larva de *H. illucens* (24), lo cual corresponde a lo hallado en este trabajo. Sin embargo, sólo un estudio probó la actividad antimicrobiana de cepas aisladas del tracto intestinal de esta larva contra otros microorganismos. En dicho estudio, la especie *Morganella morganii* (de la larva) inhibió el crecimiento de las bacterias *Paenibacillus polymixa* y *Escherichia coli* y el del hongo *Phytophthora capsici*; y la especie *Providencia rettgeri* (de la larva) inhibió el crecimiento del mismo hongo (81).

El género *Bacillus* es conocido por tener varias especies que producen antibióticos sintetizados por mecanismos ribosomales y no ribosomales (101), siendo la mayoría de los antibióticos estudiados polipéptidos de bajo peso molecular (102). Estos péptidos antimicrobianos poseen diferentes estructuras químicas que incluyen a las bacteriocinas, glicopéptidos, lipopéptidos y péptidos cíclicos (103) y debido a la gran diversidad química y a la actividad frente a varios patógenos que poseen, los péptidos producidos por el género *Bacillus* son considerados actualmente alternativas muy promisorias frente a las infecciones por patógenos multiresistentes (104).

Específicamente, la especie *B. amyloliquefaciens* se encuentra tanto en suelos, plantas y en algunos animales (105), en este caso, fue encontrada en la larva de *H. illucens*. Existen algunas cepas de esta especie que poseen notables diferencias en sus genomas y que a su vez, estas diferencias les confieren diferentes habilidades con respecto a su actividad antibacteriana y antifúngica (106–108). Adicionalmente, estas cepas fueron positivas para las pruebas amilasa, celulasa y

proteasa, por lo que estas características les dan un potencial valor aplicativo en la industria y salud debido a su actividad enzimática (Tabla 13) (109).

Estudios previos han reportado la producción de metabolitos secundarios como lipopéptidos, surfactinas, fengicinas, bacilomicinas, entre otros, por parte de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (110,111) y algunos otros identificados más recientemente como plantazolicina (112,113) y la amylociclicin (114). Una de las cepas activas obtenidas en este trabajo fue utilizada para la extracción de sus compuestos activos a partir del cultivo en medio líquido. El cultivo de la cepa de *Bacillus sp.* seleccionada (BGS8\_5) se realizó de manera pura y estimulada con *E. coli* ATCC 25922 inactivada térmicamente, como lo realizó Benítez y colaboradores (115). En dicho estudio, la utilización de células de *E. coli* inactivadas por autoclavado (121°C durante 15 minutos) y agregadas posteriormente al cultivo puro de *B. amyloliquefaciens*, permitió que la actividad antimicrobiana de esta bacteria incrementara, razón por la cual se aplicó esta metodología en nuestro trabajo.

Se encontró que el propio sobrenadante del cultivo de la cepa activa, tanto estimulado como no estimulado con *E. coli* térmicamente inactivada, ejerce un efecto de inhibición en el crecimiento del 60% para *E. coli* y *S. enterica* y del 70% para *S. aureus* (Gráficas 1, 2 y 3). De los extractos obtenidos de este sobrenadante y del pellet bacteriano, la mayor actividad obtenida fue de la fracción acetato de etilo del sobrenadante del cultivo estimulado (Tabla 17) con valores de MIC de 1mg/ml para las tres cepas patógenas mencionadas (Gráficas 10, 11 y 12).

De manera similar, en un estudio (116) evalúan la actividad de 3 fracciones (hexano, cloroformo y acetato de etilo) obtenidas también del sobrenadante del cultivo de *B. amyloliquefaciens*, en donde obtuvieron a la fracción de acetato de etilo como una de las más activas y en donde evaluaron su valor de MIC como 25µg/ml frente a *S. aureus* ATCC 25923. No obstante, el valor de MIC de la fracción de acetato de etilo en el presente trabajo fue de 1mg/ml para las tres cepas patógenas mencionadas. Esta diferencia puede deberse a las condiciones de cultivo (bioreactor de 10L comparado a volúmenes menores), al medio de cultivo (*modified nutrient glucose medium* o MNGA comparado con el medio LB) o a la diferencia de cepas de *B. amyloliquefaciens*.

Las subfracciones provenientes de la fracción de acetato de etilo obtenidas a partir de extracciones en fase sólida (*Solid phase extraction* o SPE) en columnas Chromabond C18, fueron también evaluadas contra las bacterias patógenas. Con la primera columna (SPE1), se obtuvieron las fracciones SPE1.1, SPE1.2 y SPE1.3 (Tabla 9) y la que presentó mayor actividad fue la SPE1.2 (Acetonitrilo – agua 1:1) con valores de MIC de 1 mg/ml para *E. coli* y 0.5 mg/ml para *S. enterica* y *S. aureus* (Gráficas 13, 14 y 15). Dicha fracción SPE1.2 fue separada con una columna cromatográfica abierta, obteniéndose una fracción metanólica y otra de acetato de etilo (Tabla 11). Si bien la fracción de acetato de etilo fue activa contra *S. aureus* (Gram positiva) y la fracción metanólica fue activa para *S. enterica* y *E. coli* (Gram negativas), los valores de MIC no fueron menores que en

la fracción SPE1.2 y por consecuencia no se concentró la actividad (Gráficas 16, 17 y 18).

Debido a esto, se utilizó una segunda columna (SPE2) con la cual se obtuvo una fracción metanólica y una fracción acuosa (Tabla 10). La evaluación preliminar de la actividad se realizó mediante la técnica de bioautografía, la cual permite avanzar en la separación con las fracciones activas y eliminar aquellas que no tienen una respuesta biológica (Tabla 19). Incluso, cuando se realiza esta metodología sobre placas de TLC sobre las cuales se ha desarrollado una corrida con solventes y los compuestos han sido separados, la bioautografía facilita la decisión del cambio de fases móviles (solventes polares, apolares, proporciones) al observar la zona que contiene los compuestos activos (117). En este caso, la actividad se concentró en la fracción metanólica con valores de MIC de 0.5mg/ml para las tres cepas patógenas utilizadas. La fracción metanólica fue separada en una placa de TLC fase normal para realizar nuevamente la técnica de bioautografía, con la cual se identificó la zona que contenía los compuestos activos (Tabla 20).

Esta placa de TLC fue enviada a Francia (Toulouse) con el objetivo de ser analizada mediante un espectrómetro de masas. En el espectro de masas obtenido, el pico de mayor intensidad corresponde al aducto  $[M+Na]^+$  del compuesto más del elemento sodio con valor de 1058.6786 m/z. Se observaron además otros picos de valor 1044 y 1030 m/z, los cuales pueden ser explicados por pérdidas consecutivas de grupos  $-CH_2$  de la cadena de ácidos grasos (Figura 14).

Adicionalmente, los picos de  $[M+H]^+$  1036, 1022 y 1008 m/z pueden ser explicados por pérdidas del elemento sodio (Na) (Figura 15). Estos mismos picos fueron observados en el estudio de Pecci y colaboradores (118), en el cual analizaron los lipopéptidos producidos por *Bacillus licheniformis* V9T14 y mediante el análisis de LC/ESI-MS/MS se observaron 3 homólogos de la surfactina C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> y C<sub>15</sub> cuyas estructuras fueron confirmadas a partir de los picos 1030, 1044 y 1058 m/z. Esto también sugiere que la zona analizada del TLC en el presente trabajo, podría contener 3 homólogos de la surfactina debido a las mismas pérdidas observadas o a la pérdida del grupo -CH<sub>2</sub> por parte de una misma molécula, como se mencionó previamente.

Estos picos también se observaron en el estudio de Zhi y colaboradores (119) donde estudian a la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* MT45 que produce altas cantidades de homólogos de surfactina (de C<sub>13</sub> a C<sub>17</sub>) y a su vez corresponde con el estándar de surfactina S3523 de Sigma® (Sigma-Aldrich) obtenido de *Bacillus subtilis*. La familia de las surfactinas (surfactina, linchenisina, pumiladicina, WH1 fungicina) han sido previamente descritas en especies como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, entre otras (104,120,121). Estas moléculas comparten una estructura cíclica de ácidos grasos (13 a 15 carbonos) unidos a un resto péptidico. Si la cadena de ácidos grasos varía en longitud, se le conoce como homólogo y si la composición de aminoácidos de la secuencia peptídica varía, se le conoce como isoforma (118).

Asimismo, la base de datos Dictionary of Natural Products (DNP versión 25:1), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y Metabolite and Tandem MS Database (MetLin) reportan un compuesto de masa exacta de 1035.683138 con la fórmula molecular  $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$  con una diferencia en masa de +0.0064 Da (6.1ppm) con respecto a la obtenida en este trabajo (Figura 16). Sin embargo, la separación en una placa de TLC no posee una alta resolución por lo que en el mismo espectro obtenido se observan algunos otros picos que podrían no corresponder a la molécula surfactina sino a otros compuestos producidos por la cepa activa obtenida del tracto intestinal de la larva de *H. illucens*.

La larva de *H. illucens* alberga en su tracto intestinal una gran diversidad de microorganismos que aún no han sido estudiados pero que, así como la especie bacteriana aislada en este trabajo, existen varias otras que pueden tener capacidades interesantes con respecto a su producción de metabolitos secundarios debido al ambiente natural en la que esta mosca normalmente se desarrolla. Este trabajo contiene información útil para futuros estudios que continúen con la búsqueda de antibióticos a partir de fuentes promisorias de la biodiversidad peruana para contribuir con el problema a nivel mundial de la resistencia antibiótica.

## VI. CONCLUSIONES

- El aislamiento y cultivo de bacterias del tracto intestinal de la larva de *H. illucens* permitió identificar 7 de cepas del género *Bacillus* con capacidad de producir compuestos antibacterianos.
- La fracción metanólica obtenida a partir de los extractos del sobrenadante del cultivo de una de las cepas activas (BG8\_7), presentó actividad contra las bacterias (ATCC): *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus* MRSA.
- Los resultados de la espectrometría de masas de la zona activa, detectada por bioautografía, indican que estos compuestos activos pertenecen a la familia del lipopéptido surfactina.

## VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el fraccionamiento del extracto metanólico para posteriores análisis con HPLC y aislar el compuesto activo para la confirmación de la presencia de homólogos de surfactina mediante MS/MS o RMN.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10 x '20 Progress--Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2013;56(12):1685–94.
2. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):155–64.
3. Moellering RC. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(1):2–9.
4. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1(DEC):1–7.
5. Clardy J, Fischbach M a, Currie CR. Primer The natural history of antibiotics. *Curr Biol*. 2009;19(11):437–41.
6. Cole ST. Who will develop new antibacterial agents? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1645):20130430.
7. Tacconelli E, Magrini N. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 2017.
8. The White House Administration. National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. Open Government National Action Plans. Washington; 2015.
9. Cecchini M, Langer J, Slawomirski L. ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN G7 COUNTRIES AND BEYOND: Economic Issues, Policies and Options for Action. 2015.
10. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? Vol. 163, *British Journal of Pharmacology*. 2011. p. 184–94.
11. RIEDLINGER J, REICKE A, ZÄHNER H, KRISMER B, BULL AT, MALDONADO LA, et al. Abyssomicins, Inhibitors of the para-Aminobenzoic Acid Pathway Produced by the Marine Verrucosipora

- Strain AB-18-032. *J Antibiot (Tokyo)*. 2004;57(4):271–9.
12. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015;517(7535):455–9.
  13. Pace NR. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science (80- )*. 1997;276(5313):734–40.
  14. Kellenberger E. Exploring the unknown: The silent revolution of microbiology. *EMBO Rep*. 2001;2(1):5–7.
  15. Lewis K, Epstein S, D’Onofrio A, Ling LL. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010;63(8):468–76.
  16. Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S. Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science (80- )*. 2002;296(5570):1127–9.
  17. Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(8):2445–50.
  18. Bertrand S, Schumpp O, Bohni N, Monod M, Gindro K, Wolfender JL. De novo production of metabolites by fungal co-culture of trichophyton rubrum and bionectria ochroleuca. *J Nat Prod*. 2013;76(6):1157–65.
  19. Wu C, Kim HK, Van Wezel GP, Choi YH. Metabolomics in the natural products field - A gateway to novel antibiotics. *Drug Discov Today Technol*. 2015;13:11–7.
  20. Kealey C, Creaven CA, Murphy CD, Brady CB. New approaches to antibiotic discovery. *Biotechnol Lett*. 2017;39(6):805–17.
  21. Spížek J, Novotná J, Řezanka T, Demain A. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37(12):1241–8.
  22. Erickson MC, Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle MP. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J Food Prot*. 2004;67(4):685–90.
  23. Liu QL, Tomberlin JK, Brady JA, Sanford MR, Yu ZN. Black Soldier Fly

- (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Reduce *Escherichia coli* in Dairy Manure. *Environ Entomol.* 2008;37(6):1525–30.
24. Jeon H, Park S, Choi J, Jeong G, Lee SB, Choi Y, et al. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Curr Microbiol.* 2011;62(5):1390–9.
  25. Choi WH, Yun JH, Chu JP, Chu KB. Antibacterial effect of extracts of *hermetia illucens* (diptera: Stratiomyidae) larvae against gram-negative bacteria. *Entomol Res.* 2012;42(5):219–26.
  26. Zaman S Bin, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus.* 2017;9(6).
  27. INS. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hopistales en Perú - 2007. 2007.
  28. García Apac C. Artículo de Revisión. *Acta Médica Peru.* 2012;29(2):99–103.
  29. Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. *Am J Phys Anthropol.* 2010 Sep;143(1):151–4.
  30. Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* (80- ). 1980 Sep 26;209(4464):1532–4.
  31. Falkinham J, Wall T, Tanner J, Tawaha K, Alali F, Li C, et al. Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(9):2735–41.
  32. Cui L, Su X-Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(8):999–1013.
  33. Mahoney JF, Arnold RC, Harris A. Penicillin Treatment of Early Syphilis- A Preliminary Report. *Am J Public Health Nations Health.* 1943;33(12):1387–91.
  34. Hays EE, Wells IC, Katzman PA, Cain CK, Jacobs FA, Thayer SA, et al.

- Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1945;159:725–50.
35. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, et al. THE CLASSIC: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Oct;439:23–6.
  36. Chopra I, Hesse L, O’neill A. Discovery and development of new antibacterial drugs. In: van der Goot H, editor. *Pharmacochemistry Library: Trends in drugs research III*. 2002. p. 213–25.
  37. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417–33.
  38. Davies J. Vicious circles: looking back on resistance plasmids. *Genetics*. 1995;139(4):1465–8.
  39. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54(1):641–79.
  40. Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2009;364(1527):2275–89.
  41. Garau J, Xercavins M, Rodríguez-Carballeira M, Gómez-Vera JR, Coll I, Vidal D, et al. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Nov;43(11):2736–41.
  42. Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*. 2010;467(7311):82–5.
  43. Fajardo A, Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(2):161–7.
  44. Shao Y, Chen B, Sun C, Ishida K, Hertweck C, Boland W. Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. *Cell Chem Biol*. 2017;24(1):66–75.
  45. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*. 2004;49(1):71–92.
  46. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 Jan 24;415(6870):389–95.

47. Funke M, Büchler R, Mahobia V, Schneeberg A, Ramm M, Boland W. Rapid hydrolysis of quorum-sensing molecules in the gut of lepidopteran larvae. *ChemBioChem*. 2008 Aug 11;9(12):1953–9.
48. Hayashi A, Aoyagi H, Yoshimura T, Tanaka H. Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *J Biosci Bioeng*. 2007;103(4):358–67.
49. Wang W-W, He C, Cui J, Wang H-D, Li M-L. Comparative Analysis of the Composition of Intestinal Bacterial Communities in *Dastarcus helophoroides* Fed Different Diets. *J Insect Sci*. 2014;14(111):1–13.
50. Zhang ZQ, He C, Li ML. Analysis of intestinal bacterial community diversity of adult *Dastarcus helophoroides*. *J insect Sci*. 2014;14(114):114.
51. Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol Ecol*. 2012 Oct;21(20):5124–37.
52. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(5):699–735.
53. Wang Y-S, Shelomi M. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. *Foods*. 2017;6(10):91.
54. Oliveira F, Doelle K, Smith R. External Morphology of *Hermetia illucens* Stratiomyidae: Diptera (L.1758) Based on Electron Microscopy. *Annu Res Rev Biol*. 2016;9(5):1–10.
55. Diener S, Zurbrügg C, Tockner K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag Res*. 2009;27(6):603–10.
56. Tomberlin JK, Adler PH, Myers HM, Tomberlin JK, Adler PH. Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environ Entomol*. 2009;38(3):930–4.
57. Myers HM, Tomberlin JK, Lambert BD, Kattes D. Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure. *Environ Entomol*. 2008;37(1):11–5.
58. Sheppard DC, Tomberlin JK, Joyce JA, Kiser BC, Sumner SM. Rearing

- Methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae): Table 1. *J Med Entomol.* 2002 Jul 1;39(4):695–8.
59. Tomberlin JK, Sheppard DC, Joyce JA. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets. *Ann Entomol Soc Am.* 2002;95(3):379–86.
  60. Craig Sheppard D, Larry Newton G, Thompson SA, Savage S. A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresour Technol.* 1994 Jan 1;50(3):275–9.
  61. Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. Ability of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae to Recycle Food Waste. *Environ Entomol.* 2015;44(2):406–10.
  62. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;65(8):385–95.
  63. Wilson MC, Mori T, Rückert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature.* 2014 Jan 29;506(7486):58–62.
  64. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):973–83.
  65. Park SI, Kim JW, Yoe SM. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Dev Comp Immunol.* 2015;52(1):98–106.
  66. Zheng L, Crippen TL, Singh B, Tarone AM, Dowd S, Yu Z, et al. A Survey of Bacterial Diversity From Successive Life Stages of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) by Using 16S rDNA Pyrosequencing. *J Med Entomol.* 2013;50(3):647–58.
  67. Kim KM, Lee JY, Kim CK, Kang JS. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Arch Pharm Res.* 2009;32(5):711–5.
  68. Lee JK, Lee YY, Park KH, Sim J, Choi Y, Lee SJ. *Wohlfahrtiimonas* larvae sp. Nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.*

- 2014;105(1):15–21.
69. Tille P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. In: Laboratory Medicine. 13th ed. Elsevier; 2013. p. 97.
  70. Pinto-Tomás A, Uribe-Lorío L, Blanco J, Fontecha G, Rodríguez C, Mora M, et al. Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). *Rev Biol Trop*. 2007;55(2):401–15.
  71. Thompson M, Bonavia A, Thompson M, Schryver B, Ehrhardt R. BACTERIA CRYOPRESERVATION PROTOCOL. *Protoc Exch*. 2012 Mar 8;
  72. Lane D. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Modern Microbiological Methods)*. 1991. p. 115–75.
  73. Polak-Berecka M, Waśko A, Koston D. Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *J Maria Curie-Skłodowska Univ*. 2009 Jan 1;64(1):15–24.
  74. Alajlani M, Shiekh A, Hasnain S, Brantner A. Purification of Bioactive Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strain BIA. *Chromatographia*. 2016;79(21–22):1527–32.
  75. Franklin R. Cockerill, III M, Matthew A. Wikler, MD, MBA, FIDSA Jeff Alder, PhD Michael N. Dudley, PharmD, FIDSA George M. Eliopoulos, MD Mary Jane Ferraro, PhD, MPH Dwight J. Hardy, PhD David W. Hecht M. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved atandard. Vol. 32, *Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS*. 2012.
  76. Arasu MV, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere*. 2013;90(2):479–87.
  77. Pluskal T, Uehara T, Yanagida M. Highly accurate chemical formula prediction tool utilizing high-resolution mass spectra, MS/MS

- fragmentation, heuristic rules, and isotope pattern matching. *Anal Chem.* 2012;84(10):4396–403.
78. Ohkuma M, Kudo T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):461–8.
  79. SHINZATO N, MURAMATSU M, MATSUI T, WATANABE Y. Phylogenetic Analysis of the Gut Bacterial Microflora of the Fungus-Growing Termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(4):906–15.
  80. Yu H, Wang Z, Liu L, Xia Y, Cao Y, Yin Y. Analysis of the Intestinal Microflora in *Hepialus gonggaensis* Larvae Using 16S rRNA Sequences. *Curr Microbiol.* 2008 Apr 9;56(4):391–6.
  81. Kim E, Park J, Lee S, Kim Y. Identification and Physiological Characters of Intestinal Bacteria of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*. *Korean J Appl Entomol.* 2014;53(1):15–26.
  82. Ferrari BC, Winsley T, Gillings M, Binnerup S. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1261–9.
  83. Sherpa RT, Reese CJ, Montazeri Aliabadi H. Application of iChip to Grow “Uncultivable” Microorganism and its Impact on Antibiotics Discovery. *Journ Pharm Pharm Sci.* 2015;18(3):303–15.
  84. Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4748–55.
  85. Dewi Puspita I, Kamagata Y, Tanaka M, Asano K, Nakatsu CH. Are Uncultivated Bacteria Really Uncultivable? *Microbes Environ.* 2012;27(4):356–66.
  86. Pham VHT, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol.* 2012;30(9):475–84.
  87. Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(20):6386–90.

88. Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res.* 2010 Oct 20;165(8):674–86.
89. Hütt P, Shchepetova J, Lõivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J Appl Microbiol.* 2006;100(6):1324–32.
90. Goderska K, Czarnecki Z. Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *J Microbiol* [Internet]. 2007;1(1):65–78. Available from: [http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=Refine&qid=26&SID=Q1n1aIendJD7a84LHC3&page=1&doc=40](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=26&SID=Q1n1aIendJD7a84LHC3&page=1&doc=40)
91. Zheng PX, Fang HY, Yang HB, Tien NY, Wang MC, Wu JJ. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(2):168–74.
92. Lorentz RH, Ártico S, da Silveira AB, Einsfeld A, Corcao G. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(5):541–7.
93. Henriksen D, Phillips DR, Peterson D. Polymyxin E production by *P. amylolyticus*. *Lett Appl Microbiol.* 2007;45(5):491–6.
94. Scherlach K, Hertweck C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem.* 2009 May 7;7(9):1753.
95. Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. 2012;
96. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86(6):973–83.
97. Craney A, Ozimok C, Pimentel-Elardo SM, Capretta A, Nodwell JR. Chemical Perturbation of Secondary Metabolism Demonstrates Important Links to Primary Metabolism. *Chem Biol.* 2012 Aug 24;19(8):1020–7.
98. Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to

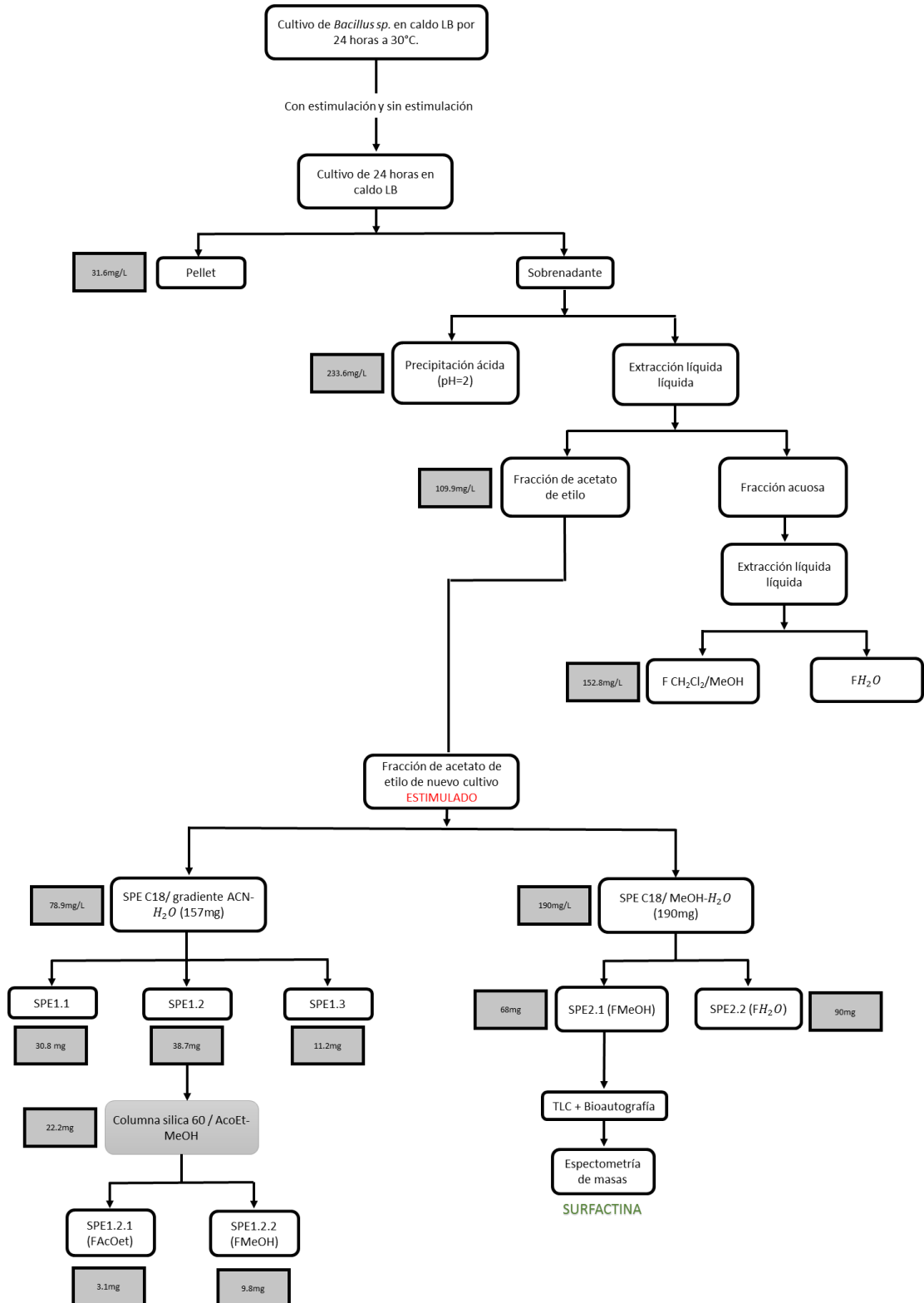
- enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv.* 2014;32(6):1180–204.
99. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface.* 2014;11(96):20140065–20140065.
  100. Zuck KM, Shipley S, Newman DJ. Induced production of N-formyl alkaloids from *aspergillus fumigatus* by co-culture with *streptomyces peucetius*. *J Nat Prod.* 2011;74(7):1653–7.
  101. Nakano MM, Zuber P. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit Rev Biotechnol.* 1990;10(3):223–40.
  102. Mannanov RN, Sattarova RK. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chem Nat Compd.* 2001;37(2):117–23.
  103. Baidara P, Mandal SM, Chawla N, Singh PK, Pinnaka AK, Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express.* 2013;3(1):2.
  104. Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus* : a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2014;61(2):93–103.
  105. Chen JN, Wei CW, Liu HC, Chen SY, Chen C, Juang YM, et al. Extracts containing CLPs of *Bacillus amyloliquefaciens* JN68 isolated from chicken intestines exert antimicrobial effects, particularly on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Mol Med Rep.* 2016;14(6):5155–63.
  106. Romano A, Vitullo D, Senatore M, Lima G, Lanzotti V. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *J Nat Prod.* 2013;76(11):2019–25.
  107. Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Antifungal activity of *bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5942–4.
  108. Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front*

- Microbiol. 2015;6(JUL):1–11.
109. Heo K, Cho KM, Lee CK, Kim GM, Shin JH, Kim JS, et al. Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* cb1 and its gene cloning. *J Microbiol Biotechnol.* 2013;23(7):974–83.
  110. Chen XH, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mögel G, Kunz S, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol.* 2009 Mar 10;140(1–2):38–44.
  111. Boottanun P, Potisap C, Hurdle JG, Sermswan RW. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express.* 2017 Dec;7(1):16.
  112. Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Süssmuth RD, et al. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol.* 2011;193(1):215–24.
  113. van Kuijk S, Noll KS, Chikindas ML. The species-specific mode of action of the antimicrobial peptide subtilosin against *Listeria monocytogenes* Scott A. *Lett Appl Microbiol.* 2012 Jan;54(1):52–8.
  114. Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol.* 2014;196(10):1842–52.
  115. Benitez L, Correa A, Daroit D, Brandelli A. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 2011;62(3):1017–22.
  116. Kadaikunnan S, Rejiniemon T, Khaled JM, Alharbi NS, Mothana R. In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14(1):9.
  117. Choma I, Jesionek W. TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography.* 2015;2(2):225–38.
  118. Pecci Y, Rivardo F, Martinotti MG, Allegrone G. LC/ESI-MS/MS

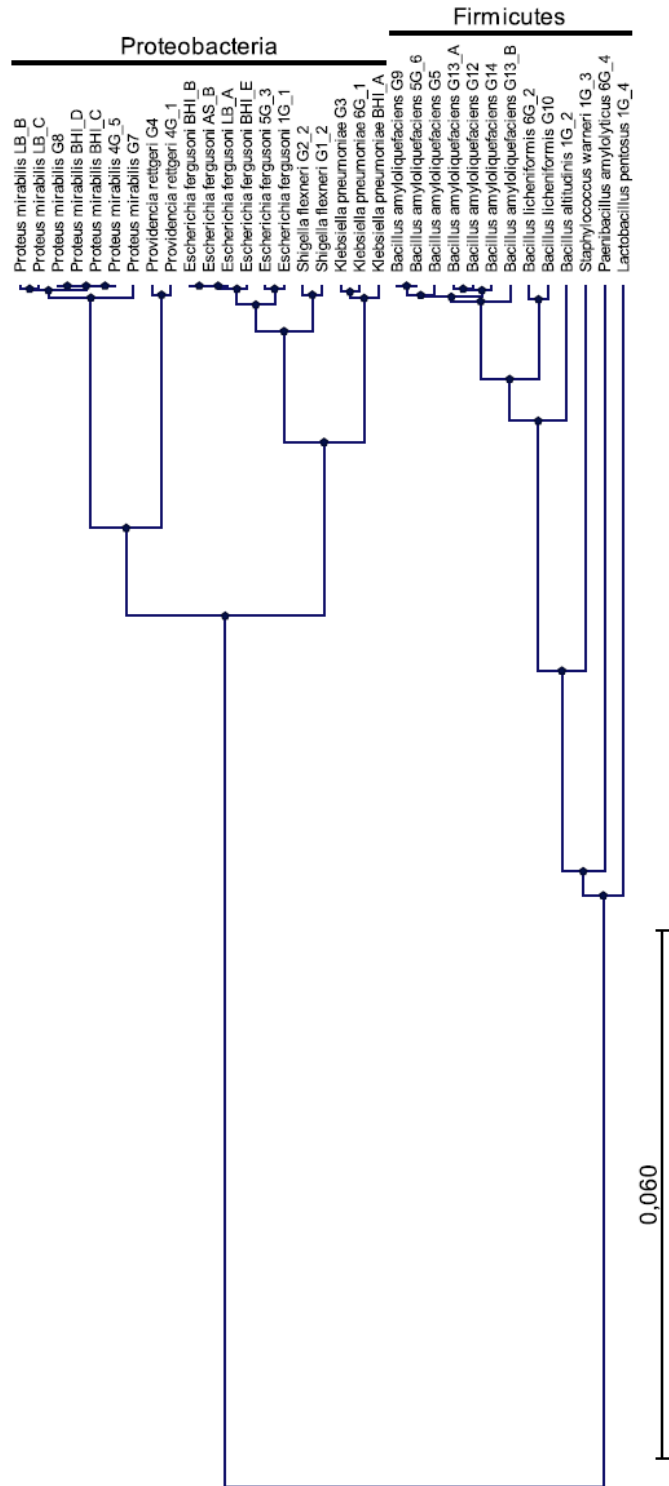
- characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *J Mass Spectrom.* 2010;45(7):772–8.
119. Zhi Y, Wu Q, Xu Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci Rep.* 2017;7:1–13.
  120. Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Sep;47(3):180–6.
  121. Kim KM, Lee JY, Kim CK, Kang JS. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Arch Pharm Res.* 2009 May 27;32(5):711–5.

## **ANEXOS**

# Anexo 1: Esquema general de la metodología de fraccionamiento



## Anexo 2: Árbol filogenético de las cepas aisladas



Anexo 3: Materiales para la preparación de medios para pruebas enzimáticas

Medio	Materiales generales	Cantidad para 1L
<b>Medio para Proteasa</b>	0.5% de digerido pancreático de caseína	5g
	0.25% de extracto de levadura	2.5g
	0.1% de glucosa	1g
	1% de leche descremada	10g
	1.5% de agar	15g
<b>Medio para Lipasa</b>	1% de tween 80	10g
	1% de peptona	10g
	0.5% de NaCl	5g
	0.01% de CaCl <sub>2</sub>	0.1g
	1.5% de agar	15g
<b>Medio para Celulasa</b>	1% de carboximetil celulosa de sodio	10g
	1% de triptona	10g
	0.5% de extracto de levadura	5g
	1% de NaCl	10g
	1.5% de agar	15g
<b>Medio para Amilasa</b>	0.3% de extracto de carne	3g
	2% de almidon soluble	20g
	0.5% de peptona	5g
	0.5% de NaCl	5g
	1.5% de agar	15g

## Anexo 4: Lista de materiales y equipos para experimentos

### **Materiales en bioensayos**

- Agar Tripticasa de soya (TSA – BD BBL).
- Agar infusión cerebro corazón (Agar BHI – BD BBL).
- Caldo infusión cerebro corazón (Caldo BHI – BD BBL).
- Agar nutritivo (AN – BD Difco).
- Agar Luria Bertani (Agar LB – BD Difco).
- Caldo Luria Bertani (Caldo LB – BD Difco).
- Antibiótico Amoxicilina A8523 (Sigma-Aldrich).

### **Reactivos y solventes**

- Dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma)
- Solventes para coloración gram: cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina.
- Tween 80 (Sigma).
- Glicerol (BD Difco).
- Rojo neutro (Merck).
- Rojo Congo (Sigma).
- Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro (MTT - Sigma).
- Éter de petróleo grado HPLC (JT Baker).
- Diclorometano grado HPLC (JT Baker).
- Metanol grado HPLC (JT Baker).
- Acetato de etilo grado HPLC (JT Baker).

## Otros

- Sílica gel 60Å (0.0154-0.040 mm, Merck, Germany).
- Cartuchos SPE (Solid Phase Extraction) empacadas con sílica gel 60 Å (C18) de 0.045 mm, (Chromabond, Macherey-Nagel).
- Placas de TLC de sílica gel 60 Å (0.0154-0.040 mm) con soporte de aluminio e indicador de fluorescencia F254 de 20cm x 20cm (Merck, Germany).
- Placas de 96 pocillos para lectura de absorbancia.

## Equipos de laboratorio

- Lector de microplacas (iMark™ - Biorad).
- Incubadora con agitación (Benchtop TOU-120)
- Incubadora (GI2-2 Shel Lab)
- Rota-evaporador (Büchi R-200)
- Equipo de ultrasonido (Branson 3520)
- Centrífuga (Hettich D 78532)
- Balanza analítica (Ohaus adventurer).