

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE GENES DE
POLICÉTIDO SINTASAS TIPO I EN ACTINOMICETOS AISLADOS A PARTIR
DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS *Atta cephalotes***

DANIELA PAILLIÉ JIMÉNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE GENES DE
POLICÉTIPO SINTASAS TIPO I EN ACTINOMICETOS AISLADOS A PARTIR
DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS *Atta cephalotes***

DANIELA PAILLIÉ JIMÉNEZ

Trabajo de grado como requisito para optar al título de
QUÍMICA.

Directores

RODRIGO G. TORRES SAEZ, Bioquímico, *Ph.D.*
Escuela de Química

CLAUDIA C. ORTIZ LOPEZ, Microbióloga, *Ph.D.*
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

“Nunca una noche venció a un amanecer”

A mi daddy, a mi mamá y a mi Maja

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización del presente trabajo de grado, especialmente a:

Al profesor Rodrigo Torres Sáez por interesarse en desarrollar una idea como trabajo de investigación conmigo, por aceptarme como su estudiante y por su guía y enseñanzas durante todo el proceso.

A la profesora Claudia Ortiz López por aceptar guiar y dirigir junto con el profe Rodrigo mi trabajo de grado, por estar siempre pendiente y disponible para resolver mis inquietudes, por sus palabras de exigencia y aliento en los momentos necesarios.

A los dos por su paciencia, confianza y apoyo.

Al Doctor Daniel Miranda Esquivel por permitir mi entrenamiento en el Laboratorio de Entomología de la Universidad Industrial de Santander, y al estudiante de Biología Daniel Felipe Silva Tavera por su tiempo y dedicación para dirigirlo.

A la doctora Clara Sánchez, a los Bacteriólogos Andrés Rueda y Carolina Cáceres, a los estudiantes de Microbiología Erika Badillo y Fredy Delgado, y a la estudiante de Bacteriología Jennifer Tibaduiza, por su guía y apoyo en todas las actividades relacionadas con Microbiología durante este trabajo. Sin su ayuda nada de esto habría podido ser.

A mi compañera de trabajo y amiga, Jessica Andrea Hernández por enseñarme todo lo relacionado con Biología Molecular, por su tiempo y disposición siempre presentes, y por todos los momentos compartidos.

Al Doctor Jorge Hernández Torres, y a los Biólogos Oriana Serna y Oscar Torres del Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, por su gran colaboración en la preparación de las muestras de ADN para su envío a Macrogen, y por su guía para realizar el análisis de las secuencias obtenidas.

A Claudia Patricia Sánchez del Grupo de Investigación de Bioprocesos, de la Universidad de Antioquia, por donar la cepa certificada *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

Al GIBIM por el apoyo económico para este trabajo de investigación, y a todos mis compañeros del grupo por su colaboración, especialmente a aquellos que me dieron su confianza y siempre estuvieron dispuestos a escucharme.

A mi papá René, a mi mamá María Margarita y mi hermana María Elisa, agradezco inmensamente por todo su constante apoyo en todas las formas posibles, por aceptar mis decisiones aunque consideraran que no eran las más fáciles, por creer en mí, por no dejarme caer, por su confianza y tanto amor.

Por siempre estar ahí para mí, por su escucha y sus palabras, por tantos momentos de grandes risas, llantos y demás emociones compartidas, por todo lo que me enseñaron con su vida y forma de ser, agradezco a Camilo (T.U.T.M), Lina, Daissy, Mary, Karla, Diego, Julio, Mayra, Sebastián, Elkin y Vanessa. Ustedes son mi UIS.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	22
1.1. HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS	22
1.1.1. Generalidades	22
1.1.2. Mutualismo tripartito entre hormigas, su jardín de hongo y actinomicetos	23
1.1.3. Hormigas cortadoras de hojas del género <i>Atta</i>	25
1.2. ACTINOMICETOS	26
1.2.1. Generalidades y clasificación taxonómica	26
1.2.2. Actinomicetos del género <i>Streptomyces</i>	30
1.3. POLICÉTIDOS	31
1.3.1. Definición	31
1.3.2. Clasificación	32
1.3.3. Biosíntesis	33
1.4. ANTECEDENTES	37
1.4.1. Aislamiento y caracterización de actinomicetos con actividad antimicrobiana, a partir de hormigas cortadoras de hojas	37
1.4.2. Diseño de <i>primers</i> específicos para genes de PKS-I	42
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. OBJETIVO GENERAL	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	47
4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS	47
4.2. RECOLECCIÓN DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS	48
4.3. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LAS HORMIGAS RECOLECTADAS	49
4.4. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOMICETOS NATIVOS	49
4.5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	51
4.5.1. Caracterización macroscópica	51
4.5.2. Caracterización microscópica	51
4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	52
4.6.1. Aislamiento de ADN genómico de los actinomicetos aislados	52
4.6.2. Amplificación por PCR y purificación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados	54
4.6.3. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados	58
4.7. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE ACTINOMICETOS	58
4.8. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE PKS-I DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	59
4.8.2. Amplificación por PCR y purificación de genes de PKS-I de los actinomicetos aislados	59
4.8.2. Secuenciación de los genes de PKS-I identificados en los actinomicetos aislados	61
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LAS HORMIGAS RECOLECTADAS	63
5.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOMICETOS NATIVOS	64
5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	65

5.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	80
5.4.1. Aislamiento de ADN genómico de los actinomicetos aislados	80
5.4.2. Amplificación por PCR del ADNr 16S de los actinomicetos aislados	81
5.4.3. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados	82
5.5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE PKS-I DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	88
5.5.1. Amplificación por PCR de genes de PKS-I de los actinomicetos aislados	88
5.5.2. Secuenciación de los genes de PKS-I identificados en los actinomicetos aislados	91
6. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	94
CONCLUSIONES	95
RECOMENDACIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación del filo Actinobacteria. La barra representa cinco sustituciones de nucleótidos en 100 nucleótidos. Tomada de Stackebrandt y col. (2006) ³⁹ .	28
Figura 2. Ruta básica de biosíntesis de policétidos. A, B, C y D indican los distintos grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica ⁴¹ .	34
Figura 3. Diluciones decimales a partir de la solución 10 ⁻¹ .	50
Figura 4. Montaje del microcultivo de cada uno de los actinomicetos aislados.	52
Figura 5. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac1b en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	66
Figura 6. Tinciones de las colonias de Ac1b con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	67
Figura 7. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2a en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	68
Figura 8. Tinciones de las colonias de Ac2a con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	69
Figura 9. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2b en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	70
Figura 10. Tinciones de las colonias de Ac2b con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	71
Figura 11. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2c en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	72
Figura 12. Tinciones de las colonias de Ac2c con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol	72

Figura 13. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2d en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	73
Figura 14. Tinciones de las colonias de Ac2d con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	74
Figura 15. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2e en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	75
Figura 16. Tinciones de las colonias de Ac2e con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	75
Figura 17. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2f en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.	76
Figura 18. Tinciones de las colonias de Ac2f con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.	77
Figura 19. Actinomicetos aislados de hormigas obreras de <i>A. octospinosus</i> . Las cepas de <i>Streptomyces</i> son numeradas como S1-S9 y las de <i>Pseudonocardia</i> como P1-P2. Tomada de Barke y col. (2010) ⁵⁰ .	79
Figura 20. Ejemplo del crecimiento de los actinomicetos aislados, en caldo ATCC-2, por incubación de 3 días, con agitación de 150 rpm y 25 - 30°C.	81
Figura 21. Gel de agarosa 1.5 % con los productos de la amplificación del ADNr 16S de los actinomicetos nativos. Carriles, M: marcador de peso molecular <i>Hyperladder II</i> ; 1: Ac1b; 2: Ac2a; 3: Ac2b; 4: Ac2c; 5: Ac2d; 6: Ac2e; 7: Ac2f.	82
Figura 22. Árbol filogenético construido con las cepas nativas y cepas de <i>Streptomyces</i> spp. de la base de datos NCBI.	86
Figura 23. Árbol filogenético construido con las cepas nativas, cepas de <i>Streptomyces</i> spp. y <i>Nocardia</i> spp. de la base de datos NCBI.	87

Figura 24. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación de genes de PKS-I de los actinomicetos nativos. Carriles, M: marcador de peso molecular *Hyperladder II*; 1: *S. clavuligerus*; 2: *S. chartreusis* ISP 5085 (Ac1b); 3: *Streptomyces* sp. BS11 (Ac2a); 4: *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6 (Ac2b); 5: *Streptomyces* sp. 1356 (Ac2d); 6: *S. triostinicus* (Ac2e); 7: *S. seoulensis* DA07118 (Ac2f).

89

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reactivos y equipos principales empleados	47
Tabla 2. Secuencias de los <i>primers</i> universales 27F/1492R	55
Tabla 3. Concentraciones de los reactivos para la amplificación por PCR del ADNr 16S	55
Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación por PCR del ADNr 16S	56
Tabla 5. Secuencia de los <i>primers</i> degenerados K1F/M6R	59
Tabla 6. Concentraciones de los reactivos para la amplificación por PCR de genes de PKS-I	60
Tabla 7. Programación del termociclador para la amplificación PCR de genes de PKS-I	61
Tabla 8. Clasificación taxonómica de las hormigas recolectadas	63
Tabla 9. Comparación de las características morfológicas macro y microscópicas de las cepas aisladas	78
Tabla 10. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias del ADNr 16S de las cepas aisladas de actinomicetos	83
Tabla 11. Tamaños bandas amplificadas con los <i>primers</i> K1F/M6R	90
Tabla 12. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias de genes de PKS-I de las cepas aisladas de actinomicetos	91

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Composición de los medios de cultivo	107
Anexo B. Marcador de peso molecular <i>Hyperladder II</i> (Bioline)	108
Anexo C. Números de acceso del GenBank de las secuencias del ADNR 16s de cepas de la base de datos NCBI	109

RESUMEN

TÍTULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE GENES DE POLICÉTIDO SINTASAS TIPO I EN ACTINOMICETOS AISLADOS A PARTIR DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS *Atta cephalotes*.*

AUTORA: Paillié Jiménez Daniela**

PALABRAS CLAVE: Actinomicetos, *Atta cephalotes*, Actividad antimicrobiana, Policétido sintasas.

DESCRIPCIÓN:

Las hormigas pertenecientes a la tribu Attini, conocidas como cortadoras de hojas viven en un mutualismo tripartito con hongos del género *Leucoagaricus*, que proporcionan el alimento a las hormigas, y con actinomicetos productores de antibióticos como ectosimbiontes. Estas bacterias son seleccionadas de forma natural por la hormiga con el fin de proteger el hongo simbiote de otros hongos parásitos. Tradicionalmente los actinomicetos han constituido una fuente importante de nuevos metabolitos con actividad antibiótica. Entre ellos se destacan los macrólidos policétidos, cuya biosíntesis depende del complejo multienzimático policétido sintasa PKS. Por consiguiente la evaluación de la distribución de sistemas biosintéticos PKS, constituye una estrategia adecuada para determinar la posible producción de antibióticos a partir de actinomicetos. En este trabajo de investigación preliminar, se aislaron siete cepas nativas de actinobacterias asociadas a la cutícula de las hormigas cultivadoras de hongo *Atta cephalotes* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Formicidae). Estas se caracterizaron de acuerdo con sus características morfológicas (macro y microscópicas) y moleculares (ADNr 16S). Adicionalmente se identificaron genes de PKSs Tipo I en los actinomicetos aislados, empleando *primers* específicos para estas secuencias. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la comunidad cultivable de actinomicetos es diversa y constituye una potencial fuente para el desarrollo de nuevos antibióticos.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Directora: Claudia Ortiz López.

ABSTRACT

TITLE: PRELIMINARY ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYPE I PKS GENES IN ACTINOMYCETES ISOLATED FROM LEAF CUTTER ANTS *Atta cephalotes*.*

AUTHOR: Paillié Jiménez Daniela **

KEYWORDS: Actinomycetes, *Atta cephalotes*, Antimicrobial activity, Polyketide synthases.

SUMMARY

Ants belonging to Attini tribe known as leaf-cutter ants represent one of the insects with major geographical dispersion and adaptability in South America. They live in a tripartite mutualism with fungi of genus *Leucoagaricus*, which provides food to ants, and antibiotic-producing actinomycetes as ectosymbionts. These bacteria are naturally selected by the ants in order to protect the symbiotic fungus from other fungi and parasites. Actinomycetes traditionally have been an important source of new metabolites with antibiotic activity. Among them are the macrolide polyketides, which biosynthesis depends upon a complex multienzyme polyketide synthase PKS. Therefore the assessment of the distribution of PKS biosynthetic systems is an appropriate strategy to determine the possible production of antibiotics from actinomycetes. In this preliminary research work, were isolated and characterized seven strains of actinomycetes associated with the cuticle of fungus-growing ants *Atta cephalotes* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Formicidae); they were characterized according to their morphological (macro and microscopic) and molecular characteristics (16S rDNA). Additionally, Type I PKS genes were identified in the isolated actinomycetes using specific primers for these sequences. The results of this study suggest that the cultivable actinomycete community is diverse and is a potential source for development of new antibiotics.

* Degree work

** Science Faculty, School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez.
Health Faculty, School of Bacteriology and Clinical Laboratory. Director: Claudia Ortiz López.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr 16S	ADN ribosómico de la subunidad 16S
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Aciltransferasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albúmina de suero bovino
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
CS	Agar Almidón-Caseína
DAP	Ácido diaminopimélico
DH	Deshidratasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ER	Enoilreductasa
ESI-TOF	Ionización por electrospray con analizador de tiempo de vuelo
g	Gramos
g/ml	Gramos por mililitro
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
kb	Kilobase
KR	Cetorreductasa
KS	Cetosintasa
LC	Cromatografía líquida
MS	Espectrometría de masas
μM	Micromolar
μL	Microlitro

mM	Milimolar
mL	Mililitro
min	Minuto
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar Papa-Dextrosa
PKSs	Policétido sintasas
PKS-I	Policétido sintasas Tipo I
psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Svedberg
s	Segundo
sp.	Especie
spp.	Especies
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	Tris-2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol
xg	Gravedades
YME	Agar Extracto de levadura-Extracto de Malta

INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini, son endémicas de Suramérica, Centroamérica y el sur de Estados Unidos. Se caracterizan por la relación simbiótica que mantienen con un hongo basidiomiceto, cultivado en el interior de sus hormigueros, el cual requieren como alimento¹. El género *Atta* es el más común en Colombia, ya que se encuentra en un porcentaje aproximado de 80%, siendo el de mayor importancia económica².

Las hormigas cortadoras de hojas se ven amenazadas principalmente por el hongo *Escovopsis* spp., pues se ha demostrado que este tiene un efecto perjudicial sobre los jardines del hongo simbiótico, y en consecuencia afecta la supervivencia de la colonia de hormigas¹.

Durante más de diez años se han llevado a cabo diversas investigaciones que demuestran que las hormigas obreras defienden sus jardines de los hongos perjudiciales, a través de una combinación de mecanismos químicos y de comportamiento. Entre los mecanismos químicos se encuentran las secreciones de las glándulas metapleurales y actinomicetos simbióticos, presentes en la cutícula de las hormigas³.

Por su parte los actinomicetos, especialmente los del género *Streptomyces*, también han sido objeto de estudio durante décadas, debido a que son la fuente natural más importante de sustancias con diferentes actividades biológicas, como por ejemplo los compuestos policétidos. Se sabe que una amplia gama de este tipo de compuestos son biológicamente activos, y presentan aplicaciones en la medicina, la agricultura y la investigación bioquímica. Son sintetizados por los complejos enzimáticos policétido sintetasas (PKSs), y se han diseñado *primers* específicos para amplificar los genes de sus dominios, como herramienta para

identificar bacterias productoras de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica⁴.

El descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y de otros metabolitos secundarios bioactivos sigue siendo un objetivo importante en la investigación de nuevos medicamentos. La extensa búsqueda de estos compuestos ha permitido reconocer miles de moléculas bioactivas en diversos microorganismos. Sin embargo se requiere de nuevos enfoques y estrategias, con el fin de aumentar la probabilidad de descubrir sustancias con nuevas y mejores propiedades⁴.

Durante el desarrollo de este proyecto de investigación se llevó a cabo el aislamiento de actinomicetos a partir de la cutícula de hormigas cortadoras de hojas de *Atta cephalotes*, encontrando distintas colonias del género *Streptomyces* como potenciales productoras de compuestos policétidos con actividad biológica. Este trabajo constituye el primer estudio realizado en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, dirigido hacia la búsqueda de nuevos antibióticos.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS

1.1.1. Generalidades

Las hormigas se destacan dentro del importante grupo taxonómico de los insectos, por su alta diversidad, dominancia numérica e importancia ecológica, constituyendo el 20% de toda de la biomasa animal^{5, 6}. Comprenden la familia Formicidae en el orden Hymenoptera. Actualmente se reconocen alrededor de once mil quinientas especies de hormigas, descritas en todo el mundo, de las cuales el 30% corresponden a la Región Neotropical⁷.

La tribu Attini, perteneciente a la subfamilia Myrmicinae, es endémica del Neotrópico y uno de los grupos con mayor dispersión geográfica, adaptabilidad y éxito evolutivo, especialmente en Suramérica, Centroamérica y en el sur de Estados Unidos ^{1, 8, 9}. Es reconocida gracias a las hormigas denominadas comúnmente como cortadoras de hojas, de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, consideradas como atinas superiores⁹. En total la tribu Attini posee doce géneros y doscientos treinta especies; todas se valen de un hongo simbiótico característico, como fuente de alimento para sus crías, por lo cual a las atinas también se les conoce como hormigas cultivadoras de hongo^{10, 11}. La gran mayoría de estos hongos, pertenecen a los dos géneros *Leucoagaricus* y *Leucocoprinus*, que juntos constituyen la tribu Leucocoprineae en la familia Lepiotaceae (Basidiomycota: Agaricales) ¹². El hongo es cultivado en el interior de nidos subterráneos en jardines formados a partir de pedazos pequeños de hojas y flores, cortados y transportados por las hormigas obreras desde la vegetación que rodea al hormiguero¹³. Las atinas menores, las cuales no son consideradas como hormigas cortadoras de hojas, cultivan sus hongos con partes de flores, pulpa de frutas, excremento de artrópodos e insectos muertos^{10, 12}.

Aunque las hormigas obreras se nutren con la savia azucarada del material vegetal al cortarlo, la reina y las larvas se alimentan fundamentalmente de los gonglidios en el ápice de las hifas del hongo cultivado, ricos en nutrientes^{8, 14}. De esta manera las hormigas preparan el hongo con hojas que posean características que permitan su adecuado crecimiento, escogiendo follaje rico en agua, nitrógeno y fósforo, pero bajo en fibra y manganeso, ya que este elemento interfiere con la actividad metabólica del hongo simbiote¹⁵. Las hormigas acondicionan las hojas que cortan, eliminando de su superficie ceras que normalmente alojan fungicidas, y además adicionan secreciones labiales y anales que contienen enzimas digestivas, con lo cual contribuyen al crecimiento del jardín del hongo^{8, 10, 13}. Asimismo las hormigas obreras regulan las condiciones del nido, con el fin de mantener las concentraciones de humedad, temperatura y dióxido de carbono entre rangos estrechos¹⁴. El hongo por su parte, biotransforma las sustancias insecticidas naturales presentes en el sustrato del material vegetal, de manera que ya no afecte a las hormigas al ser consumido^{8, 10}.

1.1.2. Mutualismo tripartito entre hormigas, su jardín de hongo y actinomicetos

La relación de simbiosis entre las hormigas cortadoras de hojas y su jardín de hongo, es un mutualismo obligado; las hormigas dependen del hongo que cultivan para sobrevivir, por lo cual previenen la reproducción sexual de este, con el fin de evitar la pérdida de su productividad¹⁴. Como consecuencia de ello las hormigas protegen al hongo de amenazas, ya sea de otros hongos o bacterias en general, que ingresan al nido por la actividad de forrajeo, o de parásitos especializados como el hongo necrotrófico del género *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales anamórficos)^{1, 16}. De este modo el hongo también depende exclusivamente de las hormigas para sobrevivir. La estrategia de defensa por parte de las hormigas cortadoras de hojas ocurre por mecanismos químicos y de comportamiento.

Los mecanismos de comportamiento incluyen tareas específicas para cada casta dentro de la colonia de hormigas; en general, la eliminación de las esporas del hongo parásito, se lleva a cabo por parte de las obreras mínimas y menores, que lamen las superficies del jardín y recogen las esporas en el bolsillo infrabucal, formando pellets que luego depositan en cámaras especializadas de desechos dentro del nido, o fuera de él. Las obreras mayores realizan la limpieza del material infectado, retirándolo y depositándolo con los desechos^{17, 18}. Por otra parte, la defensa química implica la secreción de compuestos producidos por las glándulas metapleurales de las hormigas, además de los compuestos antimicrobianos producidos por actinomicetos que actúan como ectosimbiontes adicionales en este sistema¹⁸.

Estudios experimentales han demostrado que el control de infecciones, es una función primaria de las glándulas exocrinas metapleurales, únicas en las hormigas. Éstas son un par de estructuras ubicadas en el extremo posterolateral del tórax de las hormigas, que sintetizan una serie de compuestos antibacterianos y antifúngicos^{19, 20}. Las secreciones de las glándulas metapleurales se extienden por la cutícula de las hormigas, y son transferidas entre ellas para combatir y prevenir el desarrollo y la propagación de enfermedades dentro de la colonia. Asimismo las hormigas regulan activamente el uso de las secreciones, controlando la limpieza de la apertura de la glándula, pues se ha evidenciado que las hormigas aumentan la velocidad del aseo, durante una infección microbiana¹⁹. Entre otras investigaciones relacionadas, se ha encontrado que las secreciones de las glándulas de las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta*, están constituidas principalmente por citral, geraniol, β -citronelol, 4-metil-3-heptanol, 2-heptanona, 3-octanona, 4-metil-2-heptanona, y los ácidos fenilacético, indolacético, hexanóico y octanóico; ensayos para evaluar el efecto contra el hongo *Candida albicans*, mostraron que los más efectivos son los compuestos citral, geraniol, 4-metil-3-heptanol y los ácidos hexanóico y octanóico²¹.

Paralelamente en un trabajo pionero, Currie y col. (1999)¹ descubrieron microorganismos simbióticos en el tegumento de las hormigas cortadoras de hojas, y se sugirieron como participantes complementarios en la interacción mutualista con el hongo. Los microorganismos se identificaron como *Pseudonocardia* spp., y se describió que hacían parte de una coevolución tripartita de 50 millones de años con las hormigas y su jardín de hongo, para proteger al sistema de microorganismos patógenos, con la producción de antibióticos; la teoría, de larga data, propone que las bacterias junto con el hongo simbiote, se transmiten verticalmente por las hembras reproductivas. Diferentes estudios corroboraron las observaciones sobre la interacción entre las hormigas de *Acromyrmex* y *Pseudonocardia* spp.²², pero la evidencia reciente indica que existen diversas comunidades de actinobacterias asociadas a las hormigas cortadoras de hojas, en lugar de un único tipo de simbiotes^{23, 24, 25}. *Streptomyces* spp., *Burkholderia* spp., y *Amycolatopsis* spp., entre otras bacterias presumiblemente provenientes del suelo, también participan en la interacción multitrófica²⁵.

Tanto las secreciones de las glándulas metapleurales como los actinomicetos, están presentes en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas; en consecuencia también se ha investigado su interacción, encontrando que dichas secreciones controlan el crecimiento de los simbiotes microbianos, sobre los cuerpos de las hormigas^{26, 27}.

1.1.3. Hormigas cortadoras de hojas del género *Atta*

Las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* se caracterizan, porque su mesosoma presenta tres pares de espinas, y el pecíolo, pospecíolo y primer segmento del gáster son lisos y no poseen tubérculos como en *Acromyrmex*⁹. Las colonias están formadas por una sola reina fértil y fecunda, que puede vivir alrededor de quince años o más, y está encargada de la reproducción. La reina

posee un tamaño entre 2.4 y 2.7 cm, varias veces mayor que el de sus hijas obreras estériles, y su muerte trae consigo la desaparición de la colonia¹³. Uno de los rasgos distintivos del género *Atta*, es su alto grado de polimorfismo, que facilita el cumplimiento de las labores dentro de la colonia, de acuerdo con sus tamaños y comportamientos. De esta manera la casta obrera, se puede clasificar en: soldados u obreras mayores, las cuales poseen mandíbulas fuertes, y son las encargadas de proteger la colonia; cortadoras y obreras, que transportan el material vegetal; nodrizas y jardineras que presentan el menor tamaño dentro de la casta y se encargan del cuidado de las crías y el cultivo del hongo simbionte respectivamente²⁸. Sus nidos frecuentemente se extienden más de 100 m², alcanzan profundidades de 6 m o más, y son característicos para cada especie²⁹. En un mismo nido existen cientos de cultivos con colonias que poseen entre uno y diez millones de hormigas³⁰.

En Colombia se encuentran once especies de hormigas cortadoras de hojas de las cuales cuatro corresponden al género *Atta*, i.e: *A. cephalotes* (Linnaeus, 1758), *A. colombica* (Guérin-Ménévill, 1844), *A. laevigata* (F. Smith, 1858) y *A. sexdens* (Linnaeus, 1758); *A. cephalotes* es llamada vulgarmente como hormiga arriera y es la especie más abundante del país y la de mayor distribución en el Neotrópico^{13, 15}.

1.2. ACTINOMICETOS

1.2.1. Generalidades y clasificación taxonómica

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo y heterogéneo de microorganismos, ampliamente distribuido en diversos ecosistemas naturales; son abundantes en suelos, constituyendo entre el 20% y 60% de su población microbiana total, donde se ha demostrado que desempeñan un papel ecológico importante en la circulación de los nutrientes del suelo^{31, 32}. Justamente una de las

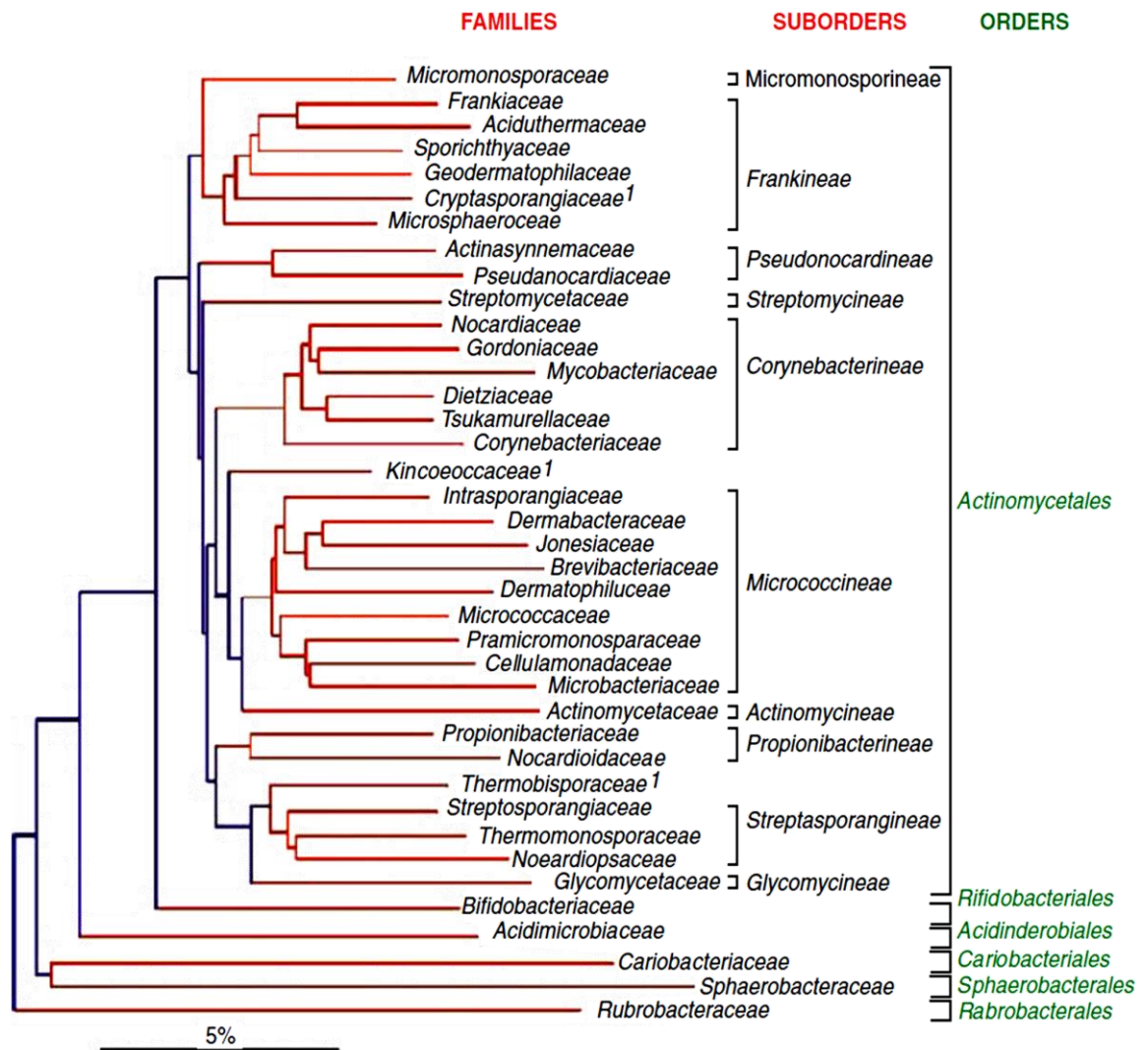
características particulares de los actinomicetos, es que presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina (1,10-dimetil-9-decalol)^{31,33}. Los actinomicetos también se han encontrado en gran medida, en ambientes acuáticos, tanto dulces como marinos^{34, 35, 36}, y participan en la degradación y mineralización de la materia orgánica de origen vegetal y animal, por la producción de enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas, entre otras³¹. Su alta actividad metabólica, frecuentemente está acompañada por la producción de metabolitos secundarios de gran diversidad química, que se propone, desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización del hábitat microbiano³².

Anteriormente los actinomicetos fueron clasificados como “hongos radiados”, ya que su morfología y desarrollo presentaban gran similitud con los demás hongos, dotados de un micelio verdadero. Sin embargo en la actualidad los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a que presentan propiedades relativas a este, como la ausencia de una membrana nuclear, sus hifas poseen diámetros inferiores a las de los hongos, entre 0.5 y 2.0 μm , la pared celular está compuesta por peptidoglicano, son sensibles a la lisozima y agentes antibacterianos, pero presentan resistencia a los antifúngicos, los flagelos, cuando se producen, son de tipo bacteriano, y la disposición de su material genético es típicamente procariótica^{31, 37}.

De esta manera los actinomicetos son bacterias Gram positivas, que se caracterizan por formar largas hifas filamentosas y esporas asexuales; las hifas se pueden ramificar y producir micelios, que pueden ser de dos tipos: micelio vegetativo y micelio aéreo. Generalmente en respuesta a la limitación por nutrientes, se desarrollan las esporas por formación de tabiques en la punta de los filamentos³⁸. Las bacterias de este tipo presentan un alto contenido de guanina y citosina (G+C) en su ADN, encontrándose en el rango de 51 a 78%. Constituyen el

orden de los Actinomycetales, el cual comprende 63 géneros, dentro del filo Actinobacteria (Figura 1)³¹.

Figura 1. Clasificación del filo Actinobacteria. La barra representa cinco sustituciones de nucleótidos en 100 nucleótidos. Tomada de Stackebrandt y col. (2006)³⁹.



En general, los actinomicetos son organismos aerobios, aunque existen algunas especies anaerobias; soportan condiciones alcalinas (pH 6.5 – 8.0) y presentan intolerancia a los ambientes ácidos. La mayoría son mesófilos, pues su crecimiento óptimo se registra entre 25 y 30°C, pero algunos *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp. y *Thermoactinomyces* sp., pueden crecer a temperaturas entre 55 y 66°C^{31,33}. Por otra parte, los actinomicetos son heterótrofos, y por consiguiente pueden utilizar como fuente de carbono, variedad de compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos; utilizan como fuente de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas³¹. Asimismo son saprófitos, y de este modo resulta probable que su población dependa de la materia orgánica disponible susceptible de descomposición³³. Aunque la mayoría de los actinomicetos son organismos de vida libre, algunas especies pueden ser patógenas de plantas, animales e incluso del humano³⁸.

Además de las propiedades morfológicas, macro y microscópicas, de los actinomicetos, los criterios para su clasificación se han basado en la quimiotaxonomía; esta establece cuatro tipos principales de pared celular bacteriana, según la composición y estructura del peptidoglicano, teniendo en cuenta sus azúcares, los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP), y la presencia de glicina en los puentes interpeptídicos. Asimismo, la quimiotaxonomía incluye el patrón de ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana, las menaquinonas y su grado de hidrogenación, el contenido y tipo de ácidos micólicos, y el porcentaje molar de la relación guanina-citosina del ADN^{31, 38}. A pesar de ello, la aplicación de técnicas moleculares al análisis de los genomas de los actinomicetos, y en general de las bacterias, ha contribuido extensamente a su clasificación taxonómica. Las subunidades 16S y 23S del ARNr son moléculas razonablemente grandes y por ende contienen información suficiente para llevar a cabo comparaciones significativas. El ARNr 16S se utiliza principalmente para los estudios filogenéticos, debido a que es más manejable para la experimentación que el de la subunidad

23S. Además la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARNr (ADNr), contiene regiones altamente conservadas y regiones muy variables, que permiten la medida de relaciones filogenéticas entre taxones cercanos o distantes, y la capacidad de resolver el dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie de los microorganismo analizados^{31, 40}.

1.2.2. Actinomicetos del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces*, junto con otros dos géneros, pertenece a la familia Streptomycetaceae, única del suborden Streptomycineae (Figura 1). Es un género enorme, que engloba alrededor de quinientas especies, las cuales se caracterizan por ser bacterias aerobias estrictas, con contenido de G+C del 69% al 78%; su pared celular es del tipo I, compuesta por ácido L-diaminopimélico y glicina. Sus hifas forman cadenas de tres hasta cincuenta o más conidiosporas inmóviles, y el micelio de sustrato o micelio vegetativo, cuando está presente no presenta fragmentación. Los miembros de este género son llamados comúnmente como estreptomicetos (del Griego, *streptos*, doblados o torcidos; y *myces*, hongos)³⁸, y a diferencia de la mayoría de las bacterias, poseen cromosomas lineales⁴¹.

El hábitat natural de la mayoría de las bacterias del género *Streptomyces* es el suelo, del cual constituyen hasta el 20% de la población cultivable. Son flexibles, desde el punto de vista nutricional, y pueden degradar sustancias resistentes como la pectina, lignina, quitina, queratina, látex y compuestos aromáticos³⁸, por la producción de gran variedad de enzimas extracelulares, entre las que destacan: proteasas, celulasas, nucleasas, amilasas, lipasas, quitinasas y xilanasas, de gran interés en el sector industrial. Adicionalmente los estreptomicetos son reconocidos por ser los productores de más de la mitad de los antibióticos utilizados. Por ejemplo, de los doce mil antibióticos caracterizados hasta el año de 1995, el 55% eran producidos por actinomicetos del género *Streptomyces*, 11% por otros actinomicetos, 12% por bacterias no filamentosas y el 22% restante por hongos

filamentosos⁴¹. Dentro de los metabolitos secundarios con actividad antibiótica, sintetizados por *Streptomyces* spp., cabe destacar un grupo de compuestos denominados policétidos entre los cuales se encuentran sustancias de gran aplicación en medicina⁴².

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Este empieza con la germinación de una spora, y se ponen en marcha una gran cantidad de procesos metabólicos durante su crecimiento, como la síntesis de proteínas, ADN, ARN, etc. Una vez formado el micelio vegetativo, solubiliza los restos orgánicos del medio en el que crece, gracias a las enzimas hidrolíticas que secreta, y los productos de degradación sirven de nutrientes para el desarrollo del micelio aéreo. Posteriormente las hifas aéreas sufren un proceso de plegamiento, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular, dando lugar a una cadena de nuevas esporas unicelulares. Las esporas maduran y posteriormente se liberan al medio, cerrando de esta manera el ciclo. En determinadas zonas de la colonia, a medida que ésta va creciendo, se produce una limitación de nutrientes y como consecuencia de esto, comienza la esporulación. Se ha observado que existe una correlación entre la diferenciación morfológica y la síntesis de metabolitos secundarios; la producción de antibióticos, por lo general coincide con el inicio de la esporulación, una vez terminado el desarrollo vegetativo^{41, 42}.

1.3. POLICÉTIDOS

1.3.1. Definición

Los policétidos son sustancias ubicuas entre los seres vivos; son metabolitos secundarios con actividades antibióticas, antifúngicas, antihelmínticas, antitumorales e inmunosupresoras, entre otras, producidos por bacterias, principalmente actinomicetos, hongos, plantas y animales^{43, 44}. Incluyen un gran

número de compuestos con estructuras químicas diversas aunque todos comparten un mismo patrón de biosíntesis. Esta comienza con la construcción de una cadena carbonada originada por la condensación sucesiva de unidades de residuos de ácidos carboxílicos⁴². Cada unidad contribuye con dos átomos de carbono al montaje de la cadena lineal, llevando el carbono- β siempre un grupo ceto; algunos de estos son eliminados por descarboxilación durante la condensación. El hecho de que existan grupos ceto alternos, da lugar al nombre de policétidos para esta familia de compuestos. Después de un número determinado de condensaciones se obtiene como producto final una cadena policetónica, que puede tener entre seis y cincuenta átomos de carbono. La cadena policetónica posteriormente sufre modificaciones para dar lugar a la formación de la estructura propia de cada policétido⁴¹.

1.3.2. Clasificación

Los policétidos se clasifican en función de su complejidad estructural en aromáticos, poliéteres y macrólidos. Como su nombre lo indica, los primeros presentan un anillo aromático en su estructura química, mientras que los policétidos poliéteres son moléculas lineales formadas a partir de una unidad iniciadora de acetato y por condensación de unidades metilmalonato o etilmetilmalonato. A diferencia de estos, los policétidos macrólidos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo macrocíclico, originado por la ciclación de la cadena policetónica correspondiente, mediante la reacción de lactonización. Son producidos generalmente por las bacterias del género *Streptomyces* y por otras bacterias filamentosas relacionadas. Los policétidos macrólidos a su vez se agrupan como polienos, por la presencia de dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico, y como no polienos si el anillo macrocíclico carece de estos⁴¹.

1.3.3. Biosíntesis

Las enzimas encargadas de la síntesis de los policétidos se conocen como policétido sintasas (PKSs). Estructuralmente las PKSs son polipéptidos multifuncionales cuyas actividades catalíticas comprenden aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS), proteína transportadora de grupos acilo (ACP), cetereductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (ER)^{41, 43}.

La biosíntesis de policétidos se da por la incorporación sucesiva de unidades de elongación a partir de una unidad iniciadora. Ambas unidades son activadas al unirse a la molécula de la coenzima A (CoA), formando los correspondientes tioésteres-CoA^{41, 42}. La unidad iniciadora puede ser acetil-, proionil- o butiril-CoA, aunque se han descrito unidades iniciadoras más complejas^{41, 44}. Por otra parte la unidad de elongación es malonil-CoA para la formación de los policétidos aromáticos, y metilmalonil- o etilmalonil-CoA para el caso de los policétidos poliéteres y macrólidos, originándose cadenas laterales metilo o etilo⁴¹.

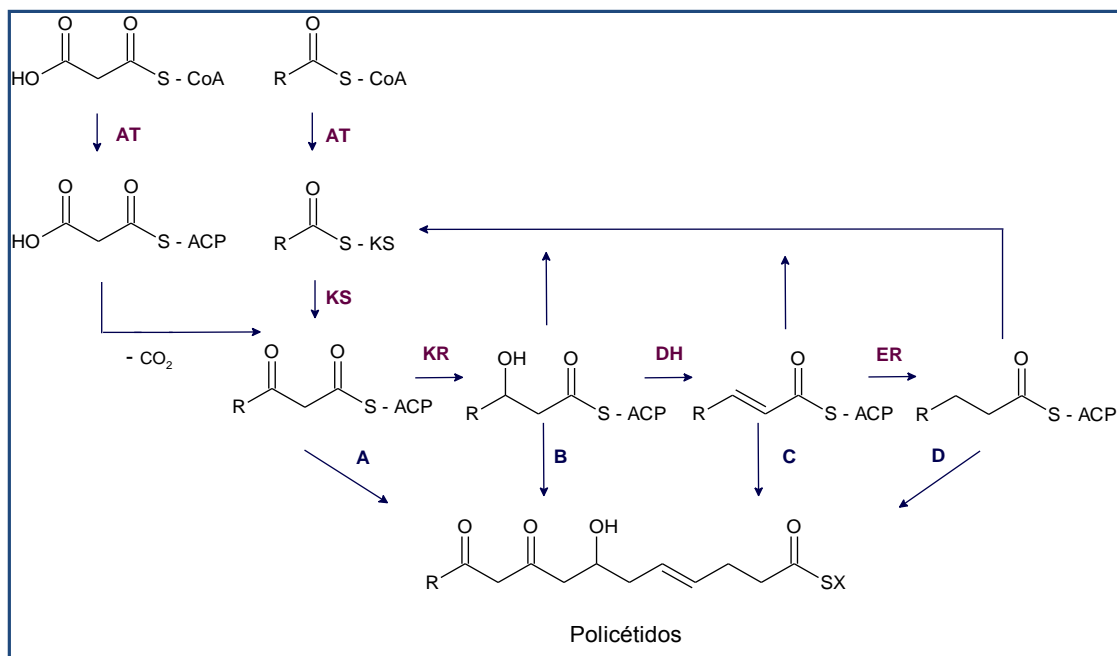
El primer paso de la biosíntesis se caracteriza por la transferencia catalizada por AT, de la unidad iniciadora desde la CoA hacia el grupo tiol de un residuo cisteína en el sitio activo de la KS, para su posterior condensación^{44, 45}. Por su parte, la unidad de elongación es trasferida por la misma AT al grupo tiol del brazo de 4'-fosfopantoteína de la ACP, la cual sirve como soporte de la cadena policarbonada en formación^{41, 42}. A continuación tiene lugar la condensación entre ambas moléculas, catalizada por el dominio KS, produciéndose la pérdida de un átomo de carbono de la unidad elongadora por descarboxilación. De esta manera se forma un residuo policetónico de cuatro átomos de carbono unido al brazo de 4'-fosfopantoteína del dominio ACP, que podría sufrir o no reacciones de β -ceterreducción, deshidratación y enoilreducción (Figura 2)⁴¹. Mediante ciclos de condensaciones de unidades de elongación llega a constituirse la cadena

policetónica la cual posteriormente se libera de la PKS por la acción de una tioesterasa (TE)⁴⁵.

Los ciclos son diferentes para todos los policétidos y pueden ocurrir reacciones como⁴¹:

- A. Condensación – condensación, que mantiene dos grupos ceto muy próximos. En este proceso de biosíntesis no existe ninguno de los dominios catalíticos de reducción.
- B. Condensación – reducción, formando grupos hidroxilo; el dominio de reducción presente es KR.
- C. Condensación – reducción – deshidratación, dando lugar a la formación de un doble enlace, pues los dominios presentes son KR y DH.
- D. Condensación – reducción – deshidratación – reducción, que origina una cadena saturada. En este caso están presentes los tres dominios funcionales KR, DH y ER.

Figura 2. Ruta básica de biosíntesis de policétidos. A, B, C y D indican los distintos grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica⁴¹.



Una vez sintetizada la cadena policetónica, pueden ocurrir una serie de reacciones de plegamiento y ciclación, que dan lugar a las estructuras características de los policétidos aromáticos o macrocíclicos, así como metilaciones, glicosilaciones y amidaciones entre otras. Estas se conocen como modificaciones post-PKS⁴¹.

1.3.4. PKSs Tipo I

Las PKSs se han clasificado en diferentes tipos de acuerdo con sus secuencias y estructuras primarias, así como a la naturaleza de las unidades de elongación que utilizan en el montaje de la cadena policetónica⁴⁶. De esta manera se clasifican en PKSs Tipo I, Tipo II y Tipo III; las tres han sido descritas en sistemas bacterianos^{44, 46}.

Las PKSs Tipo I (PKS-I), implicadas en la biosíntesis de los policétidos poliéteres y macrólidos, se componen de varias enzimas multifuncionales, cada una de las cuales presenta diferentes dominios catalíticos, dispuestos en el orden preciso en que van a ser utilizados en cada ciclo de elongación de la cadena policetónica. Por otro lado las PKSs Tipo II, conformadas por varias proteínas en un complejo multienzimático, actúan de forma reiterada para originar la cadena. Estas son las responsables de la síntesis de los policétidos aromáticos. Por último las PKSs Tipo III representan un subtipo de enzimas menos complejas, estructural y catalíticamente, que las PKSs Tipo I y II; son un grupo de proteínas homodiméricas dentro de las que se incluye la superfamilia de las sintasas chalconas. Estas también actúan fundamentalmente de forma repetida para formar policétidos aromáticos, a menudo, monocíclicos o bicíclicos^{41, 44, 46}. Las PKSs Tipo I y II se valen de la ACP para activar los sustratos acil-CoA y conducir los intermediarios policétidos en formación, mientras que las PKSs Tipo III, actúan directamente sobre el sustrato acil-CoA sin depender de la ACP⁴⁶.

A nivel genómico las PKS-I son extremadamente complejas llegando a ocupar varias decenas de miles de nucleótidos, con unidades secuenciales repetidas en el gen que dan lugar a una organización conocida como modular⁴¹.

El conjunto de actividades asociadas a una PKS-I, se encuentra distribuido a lo largo de un número variable de polipéptidos multifuncionales, que igualmente reciben el nombre de PKSs. Estos a su vez están compuestos por diferentes dominios catalíticos; los dominios KS, AT y ACP necesarios para la biosíntesis de la cadena policetónica forman una asociación invariable, mientras que los dominios catalíticos KR, DH y ER pueden estar presentes dependiendo del grado de reducción de dicha cadena. El orden de los dominios catalíticos dentro de cada módulo es: KS, AT, (DH, ER, KR cuando existan) y ACP⁴¹.

En las PKS-I, los diferentes polipéptidos que la componen actúan en un solo paso de la ruta de biosíntesis, de tal manera que existen tantos dominios catalíticos KS, AT y ACP como módulos de elongación sean necesarios para constituir la cadena policetónica. El polipéptido encargado del inicio de la biosíntesis está formado, al menos, por el módulo de “carga”, el cual toma la unidad iniciadora de la ruta biosintética. Este presenta naturalezas muy diversas, constituido por diferentes dominios en cada caso, y puede encontrarse tanto aislado del resto de polipéptidos multifuncionales, como asociado a módulos de elongación⁴¹.

El resto de PKSs encargadas de la elongación de la cadena policetónica presentan tamaños muy variables según el número de módulos de elongación que posean. La PKS implicada en el último módulo de elongación suele presentar en su extremo C- terminal un dominio tioesterasa. Este dominio es el encargado de hidrolizar el enlace entre la cadena policetónica ya formada y el brazo de 4'-fosfopantoteína del último dominio ACP. Además de esta actividad enzimática tioesterasa integrante de una PKS, existen otras proteínas

tioesterasas independientes, cuya función es corregir aquellos errores que se pueden producir durante el ensamblaje de la cadena⁴¹.

1.4. ANTECEDENTES

1.4.1. Aislamiento y caracterización de actinomicetos con actividad antimicrobiana, a partir de hormigas cortadoras de hojas

Entre las investigaciones recientes sobre las comunidades de actinobacterias relacionadas con las hormigas cortadoras de hojas y su jardín de hongo, se encuentra el trabajo de Haeder y col. (2008)³, en el que se aislaron y caracterizaron diecinueve cepas de actinomicetos, asociados a tres especies de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, recolectadas en Panamá. El aislamiento de los microorganismos se hizo a partir del exoesqueleto del cuerpo de hormigas obreras individuales, y su identificación se llevó a cabo mediante el análisis del ADNr 16S. Se verificó que a partir de la especie *A. octospinosus* se obtuvieron cuatro cepas del género *Pseudocardia*, una del género *Dermacoccus* y una del género *Streptomyces*, de *A. echinator*, una cepa del género *Pseudocardia* y una de *Streptomyces*, mientras que a partir de *A. volcanus* se aislaron diez cepas de este último y una del género *Pseudocardia*.

Con el fin de evaluar la actividad antifúngica, los actinomicetos aislados se co-cultivaron con diversos hongos patógenos como *Escovopsis aspergilloides*, *Escovopsis weberii*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*. Se observó una fuerte inhibición del crecimiento de los hongos representativos del género *Escovopsis*, por parte de algunas cepas de *Streptomyces*, y por consiguiente se determinaron las bases moleculares de su actividad. Para ello se realizó la extracción de los productos de la fermentación, de las cepas seleccionadas, cuyas fracciones bioactivas fueron analizadas por LC-UV-MS y purificadas por HPLC; la actividad de las fracciones se evaluó por el

método de difusión de disco. Igualmente se observó la inactividad de las cepas aisladas, frente al crecimiento del hongo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus*.

La fórmula molecular del macrólido antifúngico candicidina D fue dilucidada por espectrometría de masas por ESI de alta resolución, y comparando los resultados con un estándar, se corroboró su identidad. Adicionalmente se llevó a cabo la amplificación de los genes *fscA*, *fscM* y *fscP*, específicos de la biosíntesis de candicidina, usando como molde el ADN de las cepas que mostraron ser altamente bioactivas. De esta manera se concluyó que 6 de las cepas aisladas, pertenecientes al género *Streptomyces*, produjeron candicidina, y debido a que al menos una se encontró en cada especie de *Acromyrmex*, se evidenció el importante papel que juega la candicidina en la protección de los jardines de hongos de las hormigas cortadoras de hojas. Ésta sustancia fue nombrada así, en los años cincuentas, por sus propiedades antifúngicas contra *Candida albicans*, un hongo levaduriforme patógeno para el humano, responsable de la candidiasis.

Para confirmar la presencia de los actinomicetos productores de candicidina en los cuerpos de las hormigas, se preparó el ADN total de los microorganismos a partir de una sola obrera de *A. echinator*, mediante lavados con agua estéril, y se utilizó como molde para amplificar el gen *fscP*. La comparación de la secuencia obtenida, con la del gen previamente caracterizado de *S. griseus*, proporcionó la evidencia. También se demostró la existencia de los actinomicetos de interés, en el jardín del hongo simbiote, ya que la cepa que mostró mayor actividad antifúngica, fue aislada a partir de este. Por ello se concluyó que la presencia de actinomicetos, es la protección más eficiente del hongo simbiote frente a *Escovopsis* sp., mientras las biopelículas bacterianas sobre las hormigas, contribuye precisamente con la distribución de los microorganismos en el sistema, y del mismo modo las protege. Esta conclusión es apoyada por la observación de que las hormigas obreras, al preparar el material de las hojas como sustrato para el hongo simbiótico, inoculan el material con los microorganismos. Por otra parte el poco desarrollo de

resistencia a los polienos policétidos, entre los hongos patógenos, podría explicar el hecho de que las hormigas cortadoras de hojas se benefician de la presencia de microorganismos productores de candicidina.

Asimismo Oh y col. (2009)⁴⁷ estudiaron la asociación mutualista entre hormigas cortadoras de hojas y actinomicetos a nivel molecular, encontrando que la bacteria asociada con las atinas menores de *Apterostigma dentigerum*, produce un depsipéptido cíclico, para inhibir selectivamente el hongo parásito *Escovopsis* sp. La bacteria del género *Pseudonocardia* fue aislada de la cutícula de las hormigas, tomadas de una colonia en Panamá, y se observó su fuerte actividad contra el hongo parásito, mientras no tuvo ningún efecto sobre el hongo simbiote, ambos aislados del mismo nido. Los análisis iniciales por LC/MS de los extractos de los cultivos de *Pseudonocardia* sp., tanto en líquido como en sólido, revelaron la presencia de un único compuesto principal. Investigaciones posteriores con cultivos a gran escala y utilizando la técnica de HPLC, confirmaron que dicho compuesto era el responsable de la inhibición de *Escovopsis* sp., el cual llamaron dentigerumicina. Este nuevo compuesto fue aislado como un polvo blanco y su fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas, por ESI-TOF de alta resolución, acoplada a RMN de ¹H y ¹³C. La dentigerumicina aislada también inhibió el crecimiento de cepas de *C. albicans*, entre las que se destaca una cepa resistente a anfotericina.

Previamente en el año 2008, Sánchez-Peña y col.⁴⁸ publicaron los resultados de su trabajo orientado a investigar si los actinomicetos que se encuentran en la cutícula de las hormigas de la tribu Attini, también tenían propiedades inhibitoras contra hongos patógenos de plantas. Para ello se aislaron treinta y dos cepas de actinomicetos de la superficie del cuerpo de hormigas de los géneros *Atta*, *Trachymyrmex* y *Cyphomyrmex*, de los estados mexicanos de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas; morfológicamente fueron caracterizados como *Streptomyces* spp. Trece de los actinomicetos probados contra los hongos fitopatógenos

seleccionados, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* sp., inhibieron por lo menos uno de ellos. *C. lindemuthianum* fue inhibido por once actinomicetos y *R. solani* por tres, y una cepa aislada de la hormiga *Cyphomyrmex rimosus* inhibió los cinco hongos ensayados (31%- 68%).

Zucchi y col. (2010)⁴⁹ posteriormente caracterizaron la comunidad cultivable de actinobacterias, asociada con el tegumento de la hormiga cultivadora de hongo común en Brasil, *Acromyrmex subterraneus brunneus*. Un total de veinte cepas fueron aisladas, de las cuales diecisiete correspondieron a diez especies diferentes de *Streptomyces*, y las otras tres a *Pseudonocardia antartica*, *Kitassatospora paranensis* y *Propionicimonas paludicola*; la clasificación se llevó a cabo con base en su caracterización morfológica y molecular (ADNr 16S). En este trabajo también se evaluó la interacción entre las cepas aisladas y el hongo *E. weberii*, mediante una prueba de antagonismo, en la que se inocularon ambos microorganismos sobre la misma placa de agar. Los resultados demostraron variedad en las respuestas, entre las que se destaca la inhibición del hongo en un 70%. De igual forma se observó que dos cepas de *Streptomyces* y la cepa de *Pseudonocardia* no limitaron su crecimiento.

Con el objeto de discernir si estos actinomicetos mutualistas han coevolucionado con las hormigas cortadoras de hojas o si fueron adquiridos del entorno, Barke y col. (2010)⁵⁰ los aislaron de tres colonias de *A. octospinosus*, encontradas en Trinidad y Tobago. Haciendo uso de las secuencias del ADNr 16S, se identificaron dos especies de *Pseudonocardia* y nueve de *Streptomyces*. Estas fueron examinadas en bioensayos contra una cepa de *E. weberii*, aislada de un nido de *A. octospinosus*, y contra *C. albicans*. Los bioensayos revelaron que algunas cepas, tanto de *Streptomyces* como de *Pseudonocardia*, impidieron el crecimiento de ambos hongos. Sin embargo la cepa de *Pseudonocardia* presentó una actividad más débil.

De las cepas aisladas que mostraron actividad antifúngica, solo una de cada colonia se tomó para los análisis posteriores. Con la amplificación por PCR, empleando los *primers* apropiados, se observó que dos especies de *Streptomyces* contenían los genes *fscM* y *fscP* de la biosíntesis de candicidina. Su producción luego fue confirmada, al obtener el extracto del sobrenadante del cultivo de una de las cepas, y analizarlo por LC-MS/MS. La no identificación de los genes *fscM* y *fscP* con las otras cepas que exhibieron actividad, sugiere que aquellas producen nuevos compuestos que aun no han sido estudiados.

Con el fin de obtener una mayor comprensión sobre el antifúngico producido por *Pseudonocardia*, se llevó a cabo la exploración de su genoma. El análisis de la secuenciación reveló varios fragmentos de genes de PKS, con aminoácidos idénticos, en un porcentaje >90%, con proteínas implicadas en la biosíntesis de un compuesto polieno antimicótico relacionado con la nistatina. Este es producido por *P. autotrophica* y por tanto llamado NPP (del inglés nystatin-like *Pseudonocardia* polyene). Para determinarlo, el extracto de la cepa fue analizado por HPLC-MS/MS y se comparó con un estándar de nistatina A1. Este compuesto además mostró con claridad las bandas de absorción características del polieno en su espectro ultravioleta. En conjunto, los resultados evidenciaron fuertemente que el extracto derivado de *Pseudonocardia* sp., contiene un nuevo compuesto similar a la nistatina. Lo anterior está en concordancia con reportes previos acerca de que algunas bacterias de *Pseudonocardia*, asociadas con las hormigas, no poseen propiedades específicas orientadas a *Escovopsis* spp., inhibiendo variedad de hongos⁵¹.

La producción de candicidina registrada, está estrechamente relacionada con la de las cepas aisladas de las hormigas *A. octospinosus* en Panamá, apoyando la hipótesis de que dichas especies de *Streptomyces* son simbiontes mutualistas comunes de las atinas superiores, y que seguramente son adquiridas del suelo, pero consecuentemente seleccionadas y mantenidas por su beneficio. Sin

embargo el aislamiento de *Pseudonocardia* sp., sugiere la co-evolución con las hormigas. De este modo se concluyó que la diversidad de actinomicetos asociados con las hormigas, al menos de *A. octospinosus*, se adquiere a través de ambos métodos ya que, las dos posibilidades no son necesariamente excluyentes entre sí. Adicionalmente, dado que los compuestos candicidina y nistatina no son antibacterianos, ninguno está involucrado en la competencia entre las bacterias, por los recursos. Por lo tanto, la identidad de estos antifúngicos es consistente con la hipótesis de que los actinomicetos asociados a las hormigas cortadoras de hojas, son mutualistas de las hormigas y su jardín de hongo, al ser aplicados correctamente por la hormiga.

Este estudio llevó el número total de compuestos antimicóticos conocidos, asociados con hormigas atinas a tres, dos de los cuales están relacionados con *A. octospinosus*. Asimismo proporciona la primera evidencia bioquímica directa, de que la diversidad de actinomicetos simbioses se traduce en variedad de sustancias con actividad antifúngica.

1.4.2. Diseño de *primers* específicos para genes de PKS-I

Con el fin de evaluar la incidencia de los sistemas biosintéticos PKS-I en actinomicetos metabólicamente activos, se han diseñado nuevos *primers* de PCR dirigidos específicamente a ampliar las secuencias de los genes de estas enzimas. Esto se ha venido implementando como estrategia para determinar previamente cuales cepas microbianas sobresalen respecto a su potencial biosintético, y de esta manera precisar los análisis^{43, 52, 53}.

Los *primers* degenerados K1F y M6R fueron diseñados y validados por Ayuso y col. (2004)⁴³, para amplificar específicamente las secuencias de los dominios KS y metil-malonil-CoA transferasa respectivamente. Para su diseño se basaron en el alineamiento de las secuencias conocidas de ADN de once *clústeres* biosintéticos

de PKS-I modulares, caracterizados en actinomicetos e implicados en la síntesis de los compuestos Rapamicina, Rifamicina, Avermectina, Eritromicina, Oleandomicina, Niddamicina, Picromicina, FK506, FK520, Nistatina y Pimaricina. La posición y extensión de los dominios KS y AT fueron deducidas de la secuencia del *clúster* PKS-I de Rapamicina de *Streptomyces hygrosopicus* NRRL 5491.

Una vez se corroboró la especificidad de la pareja de *primers* para detectar secuencias de PKS-I con el sistema modelo, estos se emplearon para amplificar los genes de interés en una colección de doscientas diez cepas de referencia, representativas de treinta y tres géneros diferentes de actinomicetos. Las secuencias de PKS-I se encontraron en el 57% de las cepas analizadas, y se observó que su frecuencia depende del género. Por ejemplo, se obtuvieron amplicones con el 79% de las cepas del género *Streptomyces*, 68% de *Micromonospora*, 60% de *Catenuloplanes* y 22% de *Actinoplanes*. Asimismo, en las cepas representativas de las familias Actinosynnemataceae, Nocardiaceae y Pseudonocardiaceae, se detectaron genes de PKS-I con una frecuencia del 61%, 59% y 53% respectivamente.

De este modo, se demostró que la pareja de *primers* K1F/M6R puede amplificar específica y exclusivamente secuencias de módulos de metil-malonil-CoA transferasa, presentes en las cepas de actinomicetos de prueba. Por otro lado, aunque la falta de amplificación con algunas cepas puede ser un indicio de la ausencia de sistemas PKS-I, se considera la presencia de dominios metilmalonil-CoA transferasa con secuencias menos conservadas y por lo tanto, de menor homología con los *primers*.

Posteriormente Ayuso y col. (2005)⁵² probaron el rendimiento de los *primers* K1F/M6R con actinomicetos aislados de suelos tropicales, encontrando con alta frecuencia, secuencias de PKS-I en las poblaciones de *Streptomyces*, Micromonosporaceae y Nocardiaceae. Además, se evaluó la actividad

antimicrobiana de los actinomicetos aislados frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *C. albicans*. Así se corroboró que más de la mitad (62%) de las cepas aisladas de *Streptomyces* poseía actividad antimicrobiana frente a por lo menos una de las cuatro cepas de prueba, sobre todo contra las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus* (55%). Los niveles de actividad contra *E. coli* y *C. albicans* fueron del 25% y 14%, respectivamente. Estos resultados evidencian la relación que existe, entre la aparición de las secuencias de genes de PKS-I y la producción de actividades antimicrobianas, en el género *Streptomyces*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La interacción entre las hormigas cortadoras de hojas, sus jardines de hongos y los actinomicetos, es muy compleja y consiguientemente las ventajas y desventajas de esta asociación mutualista no se han comprendido completamente²¹; aunque el conocimiento acerca de los simbioses bacterianos se ha incrementado dramáticamente en los últimos años¹, su naturaleza y la base microbiológica y química de sus actividades antibióticas y antifúngicas aún no ha sido completamente dilucidada. Por otra parte los estudios relacionados, se han llevado a cabo a nivel internacional, sin que en Colombia se hayan logrado avances en este tipo de investigaciones. Es por ello que se propone ampliar el conocimiento en este campo, mediante el estudio de los genes de PKS-I de los actinomicetos presentes en hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes*, las cuales hacen parte de la mirmecofauna de la región santandereana. Adicionalmente este estudio se constituye en una primera aproximación al descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos policétidos derivados de los actinomicetos, con mayor espectro de acción y menor toxicidad, a fin de satisfacer su creciente demanda.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los actinomicetos con potencial capacidad de producir antibióticos, a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* presentes en los jardines de los terrenos de la Universidad industrial de Santander.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar actinomicetos a partir de las hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* recolectadas en los jardines de la Universidad Industrial de Santander.
- Identificar y clasificar los actinomicetos aislados de acuerdo con sus características morfológicas y moleculares.
- Determinar la presencia de genes de PKS-I en los actinomicetos aislados, empleando técnicas de biología molecular.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo y en el tratamiento de los microorganismos, fueron de grado bacteriológico y analítico. Aquellos empleados en los procesos que implicaron la manipulación de ADN fueron de grado biológico, libres de nucleasas. Los reactivos y principales equipos utilizados durante esta investigación se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos y equipos principales empleados

REACTIVOS	CASA PRODUCTORA
Agarosa	
Buffer de carga (5x)	
Buffer de reacción de PCR [160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 670 mM Tris-HCl; 0,1% estabilizador]	
Marcador de peso molecular <i>Hyperladder II</i>	Bioline
Mezcla de dNTPs (40 mM)	
Solución de cloruro de magnesio (50 mM)	
Taq. Polimerasa (5 u/μL)	
Almidón soluble	
Carbonato de calcio	
Sulfato de hierro	Carlo Erba
Sulfato de magnesio	
Nitrato de potasio	
Azul de lactofenol	
Lugol de Gram	
Safranina para Gram	Cirumedics Ltda.
Violeta de genciana para Gram	
<i>Primers</i> 27F/1492R y K1F/M6R	Integrated DNA Technologies
Acetona	
Etanol	J.T. Baker
Nistatina en suspensión	Labinco S.A.
Agar-agar	Merck

REACTIVOS	CASA PRODUCTORA
BSA	
Caseína hidrolizada	
Cloruro de sodio	
Glucosa	
PDA	
Kit <i>UltraClean™ Microbial DNA Isolation</i>	MOBIO Laboratories, Inc.
Czapek	
Extracto de carne	
Extracto de levadura	Oxoid
Extracto de malta	
Peptona	
Kit <i>Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System</i>	Promega
Almidón de papa	
Bromuro de etidio	
Caseína	
DMSO	Sigma-Aldrich
TBE (1x)	
Tween 20	
EQUIPOS	CASA PRODUCTORA
Cámara de electroforesis <i>Mini sub cell GT</i>	Biorad
Fuente de poder	
Termociclador <i>PTC – 100</i>	MJ Research Inc.
Transiluminador UV <i>Select Series TS-312E</i>	Spectroline
Agitador orbital <i>MAXQ 4450</i>	
Centrífuga <i>IEC CL31 Multispeed</i>	Thermo Scientific

4.2. RECOLECCIÓN DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS

Las muestras de hormigas obreras vivas se tomaron de forma manual, de la entrada y los alrededores de un hormiguero de *A. cephalotes* localizado en los jardines de la parte posterior del Edificio de Administración de la Universidad Industrial de Santander. La recolección se llevó a cabo empleando guantes de látex y pinzas estériles, y las hormigas se almacenaron en tubos Falcon estériles de 50 ml.

4.3. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LAS HORMIGAS RECOLECTADAS

La clasificación taxonómica de las hormigas obreras recolectadas fue determinada en el Laboratorio de Entomología, adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander. Para ello previamente se realizó un entrenamiento especial, guiado por los estudiantes de Biología, con el fin de adquirir la habilidad de distinguir entre las características de las diferentes especies de hormigas.

Empleando un microscopio estereoscópico se hizo el análisis de las hormigas, montadas en seco, siguiendo la clave de Palacio y Fernández⁹ para la determinación de la subfamilia y el género, y la clave de Mackay y Mackay² para la determinación de la especie. Así mismo se llevó a cabo la comparación de las hormigas recolectadas con ejemplares propios de la colección del Laboratorio de Entomología.

4.4. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOMICETOS NATIVOS

El aislamiento de los actinomicetos se hizo a partir de la cutícula del cuerpo completo, de una muestra de 1 gramo de hormigas. Estas fueron sumergidas en 9 mL de una solución estéril de peptona al 0.1% p/v, homogenizando con vortex durante 1 minuto. Posteriormente la suspensión obtenida fue sometida a choque térmico a 70°C mediante baño María por 10 minutos, con el fin de eliminar otras bacterias y hongos presentes en la muestra, considerados como contaminantes para el aislamiento. Una vez la solución se enfrió, se realizaron diluciones decimales hasta una concentración final de 1×10^{-4} g/mL de muestra (Figura 3).

Figura 3. Diluciones decimales a partir de la solución 10^{-1} .



Cada dilución se homogenizó con vortex durante 1 minuto y una alícuota de 100 μ L se sembró en superficie por triplicado, sobre los medios de cultivo Agar Extracto de levadura - Extracto de malta (YME), Agar Czapek y Agar Almidón-Caseína (SC), suplementados con nistatina (50 g/mL) como agente inhibidor de hongos^{49,54,55}. Los medios de cultivo fueron esterilizados previamente en autoclave a 121°C (15 psi) durante 15 minutos. Su composición se describe en el Anexo A.

Las placas de agar se incubaron en posición invertida a temperatura ambiente (25 - 30°C) durante un período de 3 a 15 días. Al observar el crecimiento de diferentes colonias, se seleccionaron aquellas que presentaron características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, típicas de actinomicetos. Posteriormente cada una de las colonias seleccionadas, se aisló individualmente por continuos repiques, empleando la técnica de siembra por agotamiento, en el medio YME. Las condiciones de incubación fueron las mismas durante todo el proceso de aislamiento, hasta obtener cultivos axénicos.

4.5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

4.5.1. Caracterización macroscópica

Como caracterización preliminar, durante el tiempo de incubación se observaron las características del crecimiento a nivel macroscópico de cada uno de los actinomicetos aislados. La descripción detallada de las colonias se hizo por inspección visual, teniendo en cuenta el tamaño, forma, textura, margen, consistencia, color del anverso y reverso, y producción de pigmentos difusibles al medio de cultivo ^{54, 56}.

4.5.2. Caracterización microscópica

Se observaron las características microscópicas de los actinomicetos aislados, mediante las tinciones de Gram y azul de lactofenol, utilizando un microscopio óptico. Los montajes con morfologías de interés se fotografiaron con una cámara digital adaptada al microscopio. La tinción de Gram se realizó según el protocolo descrito por Prescott (2004) ³⁸.

El microcultivo con cada uno de los actinomicetos aislados se hizo en el medio de cultivo Agar Papa-Dextrosa (Anexo A); en los cuatro cuadrantes y parte superior de dos bloques de agar de 1x1 cm, dispuestos sobre una lámina portaobjetos, se inoculó con el asa recta, una pequeña porción de la colonia. Previo a ello, la lámina de vidrio se acomodó sobre dos palillos de madera, en el interior de una caja Petri con papel de filtro o de arroz humedecido en el fondo, como cámara húmeda (Figura 4). Posteriormente en la superficie de cada bloque de agar se instaló un cubreobjetos y se dejó en incubación por 15 días a temperatura ambiente (25 - 30°C). Todo el material fue esterilizado con anterioridad en

autoclave a 121°C (15 psi) durante 15 minutos, y el montaje se preparó con pinzas estériles⁵⁷.

Figura 4. Montaje del microcultivo de cada uno de los actinomicetos aislados.



Pasado el tiempo de incubación se observaron al microscopio los cubreobjetos sobre una gota de azul de lactofenol depositada en una lámina portaobjetos. Para conservar las láminas se sellaron los bordes de los cubreobjetos con esmalte de uñas transparente.

4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

4.6.1. Aislamiento de ADN genómico de los actinomicetos aislados

La extracción del ADN genómico de cada uno de los actinomicetos aislados se hizo a partir del inóculo de la suspensión de esporas respectiva, en 30 mL de caldo ATCC-2 (Anexo A)⁴³. Los caldos se dejaron en agitación a 150 rpm durante tres días a temperatura ambiente (25 - 30°C). Para que el crecimiento fuera homogéneo se emplearon perlas de vidrio estériles⁵⁶. La pureza de los caldos se

examinó inoculando 100 μ L en placas estériles de agar YME, y mediante la coloración de Gram.

Las suspensiones de esporas fueron obtenidas al hacer un raspado de las cepas con espátula estéril y 2 mL de una solución estéril de Tween 20 al 0.1% v/v; el raspado se hizo de la superficie del medio YME en pico de flauta, en el que los actinomicetos crecieron durante 8 días previos. Se hizo vortex para homogenizar las suspensiones e inmediatamente se transfirieron a matraces de 300 mL⁵⁶.

Las células bacterianas de cada cepa fueron procesadas con el kit de extracción de ADN genómico *UltraClean™ Microbial DNA Isolation* según el protocolo detallado por el fabricante descrito a continuación:

- 1) 1.8 mL del caldo se adicionaron a un tubo eppendorf de 2 mL, se resuspendieron con vortex por 30 s y se centrifugaron a 10,000 x g por 30 s a 25°C, con el fin de concentrar las células de las bacterias en un *pellet*.
- 2) Una vez se eliminó todo el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en 300 μ L de la solución *MicroBead*, que contiene sales y un *buffer* que estabiliza y dispersa homogéneamente las células bacterianas antes de realizar la lisis.
- 3) Las células resuspendidas se transfirieron al tubo *MicroBead* y se adicionaron 50 μ L de la solución *MD1*. Esta solución contiene SDS y otros agentes que se requieren para lograr la lisis celular y la liberación de los ácidos nucleicos. Para aumentar el rendimiento de la extracción, el tubo se calentó a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente se hizo vortex a máxima velocidad por 10 minutos, con el tubo asegurado horizontalmente, para hacer también la lisis mecánica.
- 4) El tubo se centrifugó a 10,000 x g por 30 s a temperatura ambiente, para separar los residuos de las células, del ADN que queda en el sobrenadante, el

cual se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL. En seguida se adicionaron 100 μL de la solución *MD2*, se hizo vortex para mezclar y se dejó en refrigeración (4°C) por 5 minutos. Dado que la solución *MD2* precipita el material orgánico e inorgánico que reduce la pureza del ADN, el tubo se centrifugó por 1 minuto a $10,000 \times g$ y a temperatura ambiente.

- 5) Evitando el *pellet*, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL y se adicionaron 900 μL de la solución salina *MD3*, la cual ofrece las condiciones de salinidad necesarias para que el ADN se una a la membrana de sílica del *Spin Filter* en el siguiente paso.
- 6) Se añadieron 700 μL de la mezcla al *Spin Filter* y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 30 s a temperatura ambiente. Se descartó el fluido que pasó a través del filtro y se repitió este paso con los 450 μL de mezcla restantes.
- 7) Para lavar el ADN unido al filtro, se adicionaron 300 μL de la solución a base de etanol *MD4*. De esta manera se removieron sales y otros contaminantes. Así mismo se eliminaron las trazas de etanol centrifugando nuevamente el *Spin Filter*.
- 8) Finalmente se añadieron 50 μL de la solución *MD5*, que es un *buffer* de elución Tris 10 mM pH 8, y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 30 s a temperatura ambiente para obtener el ADN en un nuevo tubo eppendorf, el cual se conservó a -20°C para su uso posterior.

4.6.2. Amplificación por PCR y purificación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados

El ADN genómico obtenido de cada una de las cepas de actinomicetos se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen que codifica el ARNr 16S, o

ADNr 16S. Para ello se emplearon los *primers* universales 27F y 1492R^{35, 36}, cuyas secuencias se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los *primers* universales 27F/1492R

27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 30 μ L, de manera que las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes³⁶:

Tabla 3. Concentraciones de los reactivos para la amplificación por PCR del ADNr 16S

0.1 μ M	<i>Primers</i> 27F/1492R
0.2 mM	Mezcla de dNTPs
1,25U	Taq polimerasa
1X	<i>Buffer</i> de reacción
1.7 mM	MgCl ₂
10% v/v	DMSO
10% v/v	ADN extraído

La PCR se llevó a cabo en un termociclador y el programa utilizado se especifica en la tabla a continuación³⁶.

Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación por PCR del ADNr 16S

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1) Desnaturalización inicial	94	3
2) Desnaturalización	94	1
3) Alineamiento	50	1
4) Extensión	72	2
5) Volver al paso 2 por 30 veces		
6) Extensión final	72	7
7) Fin		

Los productos de la amplificación fueron examinados en un gel de agarosa 1.5% p/v en *buffer* TBE 1X pH 8, teñido con bromuro de etidio de concentración 0.5 µg/ml; la electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal a 100 voltios. Para corroborar el tamaño de las bandas de los productos de reacción se utilizó el marcador de peso molecular *Hyperladder II* (Anexo B), y asimismo para reconocer el buen funcionamiento de la PCR, se utilizaron como patrones positivo y negativo, la cepa certificada *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, donada por la Universidad de Antioquia, y agua tipo I, respectivamente. En los pozos del gel se sembraron 5 µL del marcador y 5 µL de los productos de PCR mezclados con 1 µL del *buffer* de carga 5X. El gel se reveló con luz UV sobre un transiluminador, y se tomaron fotografías con una cámara digital. El análisis del tamaño de las bandas obtenidas se realizó con el software *Quantity One*.

La purificación de los productos amplificados se hizo utilizando el kit de limpieza de productos de PCR *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* según el protocolo dado por el fabricante descrito a continuación:

- 1) Al producto de PCR se añadió un volumen igual de la solución *Membrane Binding Solution* y el volumen resultante se transfirió a una mini columna de sílica, adaptada a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto para que el ADN amplificado se uniera a la membrana de la mini columna.
- 2) Se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto y se descartó el fluido que pasó a través de la membrana.
- 3) Posteriormente se adicionaron 700 µL de la solución a base de etanol *Membrane Wash Solution* para lavar del ADN unido, y se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto. El fluido que pasó se desechó y se adicionaron 500 µL más de la solución de lavado. Esta vez se centrifugó por 5 minutos.
- 4) Para que se evaporaran todos los residuos de etanol se vació el tubo eppendorf y se re-centrifugó por 1 minuto sin la tapa de la microcentrífuga.
- 5) La mini columna se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, y se adicionaron 30 µL de agua libre de nucleasas. Se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 16,000 x g. Se descartó la mini columna y el ADN se conservó a -20°C.

Para verificar la purificación y calidad del ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa como se describió previamente; en este caso se sembró 1µL de ADN mezclado con 4 µL de agua tipo I y 1 µL del *buffer* de carga 5X.

4.6.3. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados

Los productos de la amplificación del ADNr 16S purificados, fueron enviados a MacroGen (<http://www.macrogen.com>) para su correspondiente proceso de secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el *software SeqMan* del paquete libre en internet *Lasergene 7*, y los resultados se compararon con otras secuencias de la base de datos NCBI, usando los servicios de la red informática BLAST. El análisis filogenético de las cepas identificadas se hizo con el *software MegAlign* del mismo paquete.

4.7. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE ACTINOMICETOS

Para la conservación de los actinomicetos se realizó la siembra de cada una de las cepas aisladas en el medio YME en pico de flauta, y después de 15 días de incubación a temperatura ambiente (25 - 30°C), se adicionó glicerol al 10% v/v. Posteriormente los tubos se almacenaron a temperatura de refrigeración (4°C). Igualmente se conservaron a -20°C, haciendo un raspado con espátula estéril de cada cepa, y homogeneizándola en 1 mL de glicerol al 10% v/v en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL³¹.

El mantenimiento de las cepas a corto plazo se hizo por subcultivo periódico, utilizando el medio YME; pasado el tiempo de incubación a temperatura ambiente, las cepas se almacenaron a temperatura de refrigeración.

4.8. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE PKS-I DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

4.8.2. Amplificación por PCR y purificación de genes de PKS-I de los actinomicetos aislados

A partir del ADN genómico de cada uno de actinomicetos aislados, se realizó la amplificación por PCR de genes que codifican para PKS-I, empleando los *primers* degenerados K1F y M6R⁴³, cuyas secuencias se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los *primers* degenerados K1F/M6R

K1F 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'

M6R 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'

La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 30 μ L de manera que las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes⁴³:

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos para la amplificación por PCR de genes de PKS-I

0.4 μ M	<i>Primers</i> K1F/M6R
0.2 mM	Mezcla de dNTPs
1U	Taq polimerasa
1X	<i>Buffer</i> de reacción
3 mM	MgCl ₂
1 μ g/ μ L	BSA
10% v/v	DMSO
5% v/v	ADN extraído

Estas fueron establecidas durante la experimentación, tomando como base las especificadas por Ayuso y col. (2004)⁴³.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador de acuerdo con el siguiente perfil⁴³:

Tabla 7. Programación del termociclador para la amplificación PCR de genes de PKS-I

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1) Desnaturalización inicial	95	5 min
2) Desnaturalización	95	30 s
3) Alineamiento	55	2 min
4) Extensión	72	4 min
5) Volver al paso 2 por 30 veces		
6) Extensión final	72	10 min
7) Fin		

Los productos de la reacción fueron examinados y purificados como se indica en el numeral 4.6.2.

4.8.2. Secuenciación de los genes de PKS-I identificados en los actinomicetos aislados

Los productos purificados de la PCR de genes de PKS-I presentes en los actinomicetos aislados, fueron secuenciados por MacroGen. Las secuencias fueron analizadas utilizando el *software SeqMan* del paquete *Lasergene 7*, y los resultados se compararon con otras secuencias de la base de datos NCBI, usando los servicios de la red informática BLAST. Por otra parte se hizo la búsqueda de los marcos de lectura abiertos (siglas ORF del inglés *Open reading frame*), de los

genes identificados, utilizando el buscador de ORF de NCBI, así como el análisis BLAST respectivo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LAS HORMIGAS RECOLECTADAS

Las hormigas cortadoras de hojas de la casta obrera, recolectadas para este estudio, fueron determinadas taxonómicamente como pertenecientes a la especie *A. cephalotes* mediante la utilización de la clave de Mackay y Mackay (1986)², así como la comparación con ejemplares de la colección mirmecológica del Laboratorio de Entomología. Los resultados de la clasificación taxonómica se encuentran consignados en la Tabla 8.

Entre las características puntuales que permitieron identificar a las hormigas recolectadas se destacan las siguientes²:

- El gáster no tiene tubérculos y es moderadamente liso y brillante.
- La antena tiene once segmentos: un escapo y funículo de 10 segmentos.
- El tórax posee 2 pares de espinas y poca pubescencia dorada.
- La cabeza presenta solo una espina a cada lado, es lisa y brillante, y de color más claro que el tórax.
- La espina occipital es más corta que el máximo diámetro del ojo.

Tabla 8. Clasificación taxonómica de las hormigas recolectadas

Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Sub-orden	Apocrita
Familia	Formicidae
Sub-Familia	Myrmicinae
Tribu	Attini
Género	<i>Atta</i>
Especie	<i>Cephalotes</i>
Nombre científico	<i>Atta cephalotes</i> (Linnaeus, 1758)

5.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ACTINOMICETOS NATIVOS

Las diluciones obtenidas de la muestra de hormigas de la especie *A. cephalotes*, como se describió previamente en el numeral 4.4 de la Metodología Experimental, fueron sembradas en tres medios de cultivo diferentes. Agar Czapek y SC, se emplearon como medios no selectivos de actinobacterias^{49, 55}, y YME, ya que hace parte del ISP (International *Streptomyces* Project)⁵⁴ y corresponde a un medio estándar para el aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp. (Anexo A)⁵⁴. De esta manera, se lograron aislar siete colonias nativas, presumiblemente diferentes, con características de actinomicetos, en un período de cinco meses. Así se comprobó que los medios empleados fueron adecuados para el aislamiento de actinomicetos.

Durante el aislamiento, debido a que los actinomicetos son microorganismos de crecimiento lento, los cuales no compiten eficientemente por los nutrientes³¹, se presentó una contaminación considerable con bacterias no filamentosas y hongos, de más rápido crecimiento en las placas de agar. Sin embargo, el uso de nistatina (50 g/mL)⁴⁹ permitió controlar la proliferación de los contaminantes.

Las colonias de bacterias no filamentosas se observaron al cabo de un día de incubación, y las colonias de levaduras y mohos, después de dos o tres días. Estas se descartaron con base en su morfología macroscópica; las bacterias eran colonias brillantes y cremosas, y las levaduras y mohos, tenían un tamaño considerablemente mayor al que se ha descrito para los actinomicetos³¹, además de consistencia cremosa en el caso de las levaduras.

El crecimiento de las colonias presuntivas de actinomicetos se notó después de un tiempo de incubación de tres o cuatro días. Se seleccionaron aquellas que presentaron consistencia seca y compacta, que se encontraban fuertemente adheridas al medio sólido. Estas características corresponden con la apariencia de

las colonias de actinomicetos³¹. Mediante continuos repiques en el medio YME, se aislaron las siete colonias presuntivas de actinomicetos de manera axénica, y se nombraron como Ac1b, Ac2a, Ac2b, Ac2c, Ac2d, Ac2e y Ac2f. Posteriormente fueron mantenidas por subcultivo periódico, a temperatura ambiente (25 - 30°C).

5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

Con el fin de realizar la caracterización morfológica precisa de las siete colonias presuntivas de actinomicetos, y su comparación, una vez se seleccionaron, se cultivaron en el medio YME, adecuado para el desarrollo de esporas y/o pigmentos. Este posee los nutrientes suficientes que permiten que se complete el ciclo de vida de los actinomicetos⁵⁴.

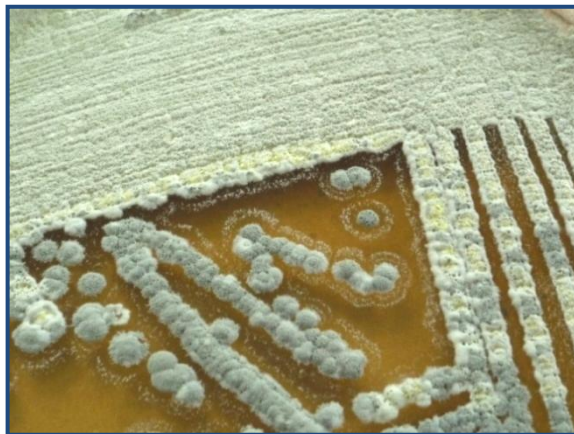
Por otra parte, la selección de las colonias que correspondían a posibles actinomicetos, también se basó en sus características microscópicas, examinadas mediante la tinción de Gram y la tinción con azul de lactofenol del microcultivo. El análisis de la microscopía óptica, mostró organismos filamentosos Gram positivos. La caracterización macro y microscópica se llevó a cabo después de quince días de incubación.

A continuación se describe en forma detallada la caracterización macroscópica y microscópica de las diferentes colonias de posibles actinomicetos aislados.

En la Figura 5 se observan las colonias denominadas como Ac1b, las cuales fueron de color verde grisáceo en el anverso, es decir, el color del micelio aéreo⁵⁴, y en el reverso, el cual corresponde al micelio vegetativo⁵⁴, de color amarillo oscuro. Por otra parte la superficie de Ac1b era aterciopelada, de elevación convexa y/o umbonada, y se apreciaron surcos alrededor de las colonias. La forma era filamentososa, y por tanto tenían margen filamentososo. Eran opacas, de

consistencia seca y dura, difíciles de tomar del medio de cultivo, y producían pigmentos difusibles al medio, ya que este se oscureció. Cada colonia tenía aproximadamente un diámetro de 4 mm. Además, se percibió el olor característico a suelo húmedo, lo que indicó la producción de geosmina^{31, 33}. También se observó la presencia de pequeñas gotas de líquido claro que demostraron la producción de metabolitos secundarios durante la esporulación³¹.

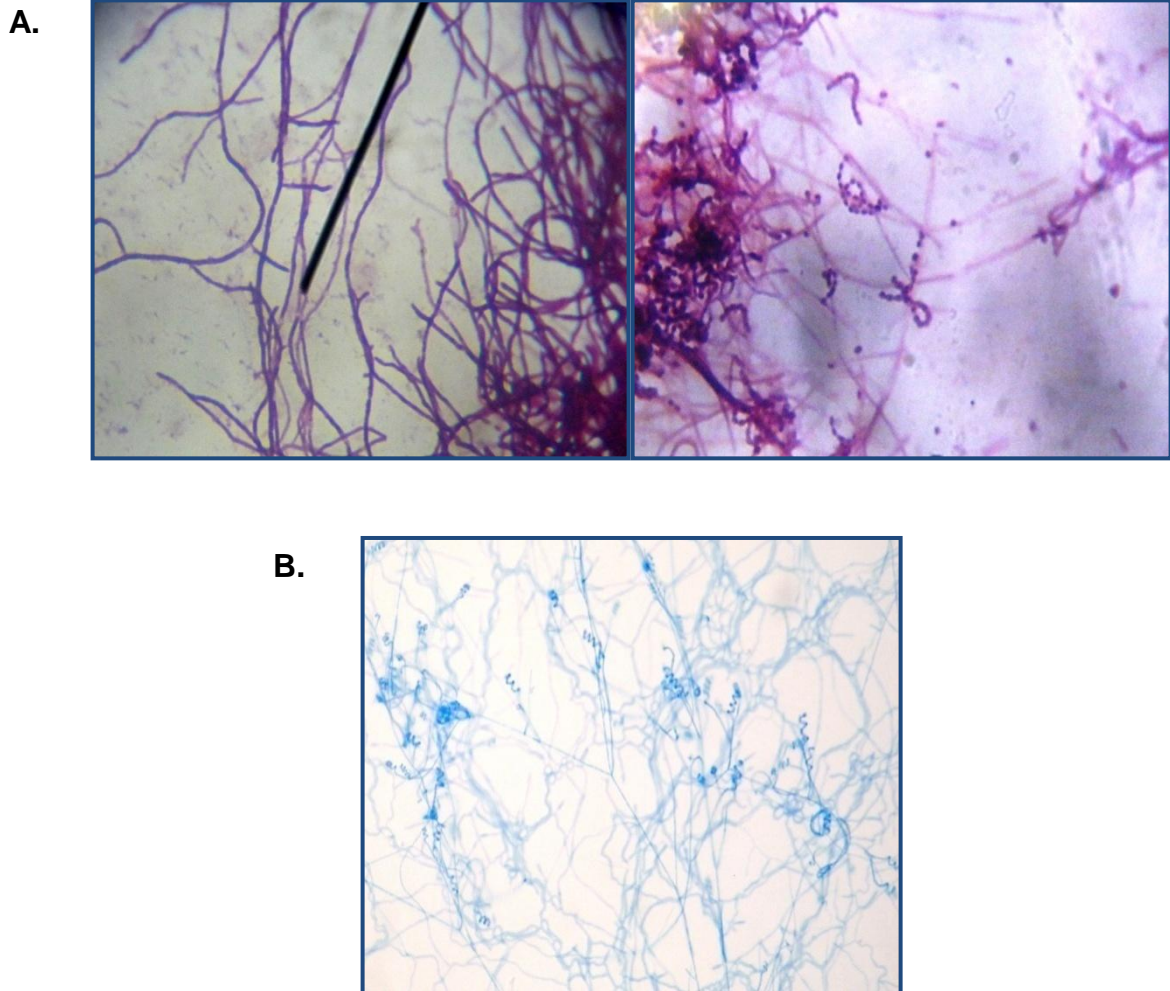
Figura 5. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac1b en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



Mediante la tinción de Gram y con azul de lactofenol (Figura 6A y 6B respectivamente), se observó que las colonias identificadas como Ac1b, presentaron al microscopio conidiosporas, tanto individuales como originadas de las ramificaciones de las hifas, organizadas en forma de cadenas largas, y enrolladas en espiral; esta propiedad es característica del género *Streptomyces*³¹.

Al realizar la tinción del microcultivo de Ac1b con azul de lactofenol, se apreció la forma de las conidiosporas de manera más precisa. Sin embargo, con ambas tinciones se observaron largas hifas delgadas onduladas y con ramificaciones no fragmentadas. Estas se originan en un centro común y se extienden formando redes que constituyen el micelio.

Figura 6. Tinciones de las colonias de Ac1b con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



En la Figura 7 se observan las colonias denominadas como Ac2a; después de siete días de incubación las colonias presentaron en el anverso, un color beige claro, mientras que a los quince días poseían un color gris oscuro. El color del reverso era de color beige. La superficie era claramente pulverulenta, opaca y de consistencia seca y frágil. Eran de forma filamentosa y molar, con margen ondulado, el cual se elevaba dejando un hueco en el centro. Produjeron pigmentos difusibles al medio de color rojo intenso y el diámetro de cada colonia fue

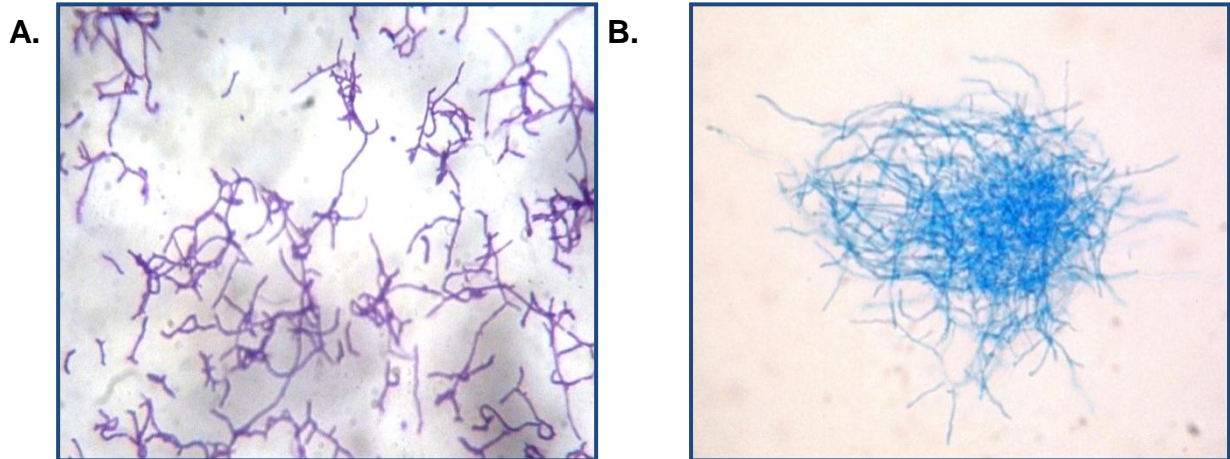
aproximadamente de 4 mm. El olor característico a tierra húmeda fue más notorio en esta colonia presuntiva de actinomiceto, en comparación con las demás.

Figura 7. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2a en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



Tanto la tinción de Gram como con azul de lactofenol (Figura 8), exhibieron el desarrollo de hifas delgadas onduladas, relativamente cortas y fragmentadas. En la imagen de la tinción con azul de lactofenol, se puede apreciar la formación de una red de hifas, que se extiende.

Figura 8. Tinciones de las colonias de Ac2a con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



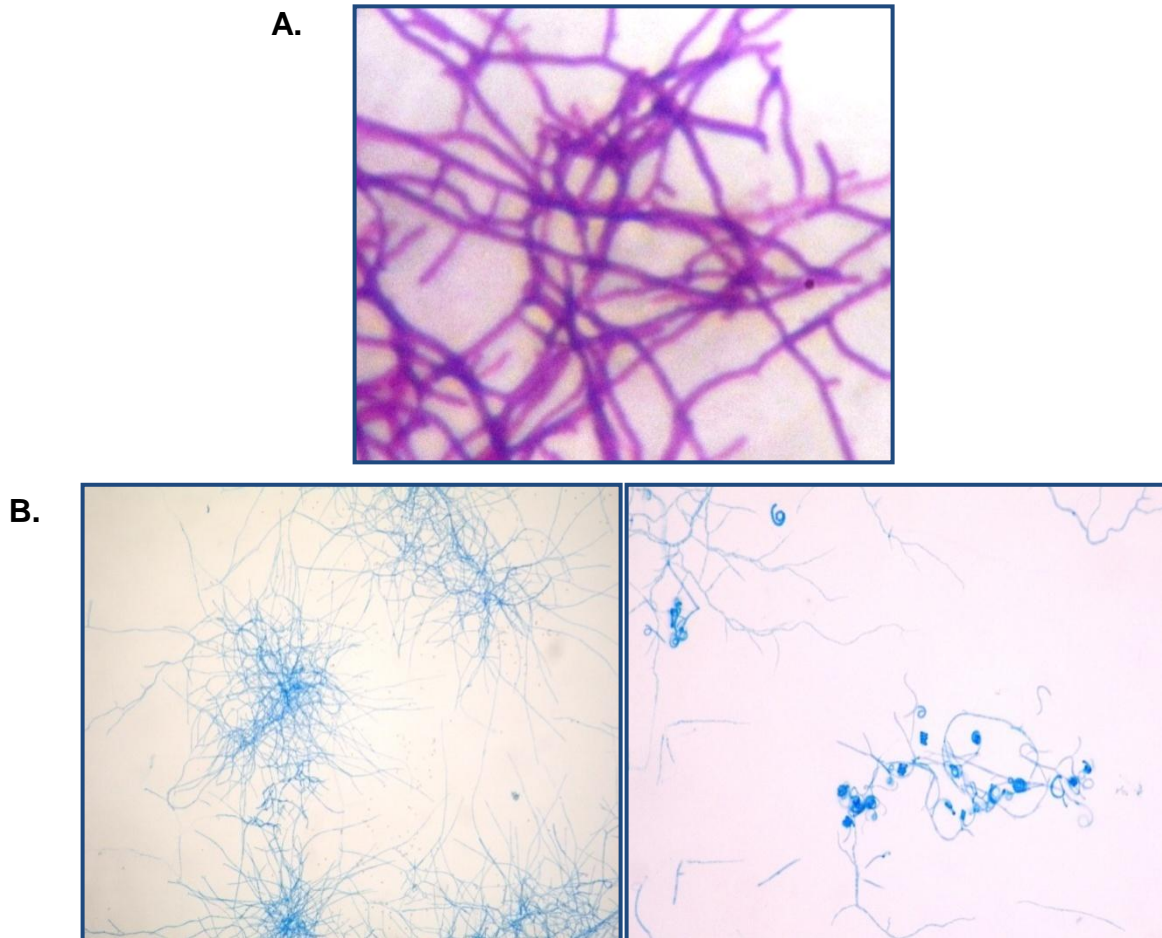
En la Figura 9 se observan las colonias de Ac2b a los siete días de incubación, las cuales eran de color blanco en el anverso, pero al cumplirse dos semanas, se tornaron de color gris; el color del reverso era amarillo oscuro y el centro de las colonias tenía una apariencia cuarteada. La consistencia era dura y seca, aunque la textura de la superficie fuera aterciopelada. Eran de lustre opaco y forma filamentosa, con margen erosionado. El pigmento difusible al medio fue de color amarillo oscuro. Las colonias tenían un diámetro aproximado de 5 mm. También se percibió el olor característico a tierra húmeda, observándose la presencia de exudado, lo cual evidenciaría la producción de metabolitos secundarios³¹.

Figura 9. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2b en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



Mediante la tinción de Gram y con azul de lactofenol (Figuras 10A y 10B respectivamente) de las colonias denominadas como Ac2b, se verificó el crecimiento de largas hifas delgadas, con ramificaciones no fragmentadas. En la imagen de la tinción con azul de lactofenol, se puede ver como los filamentos se originan en un centro común y se extienden formando redes. Asimismo, se logran ver las conidiosporas, constituyendo cadenas enrolladas, en las puntas de las hifas; por ello se infiere que la colonia corresponde a un estreptomiceto³¹.

Figura 10. Tinciones de las colonias de Ac2b con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



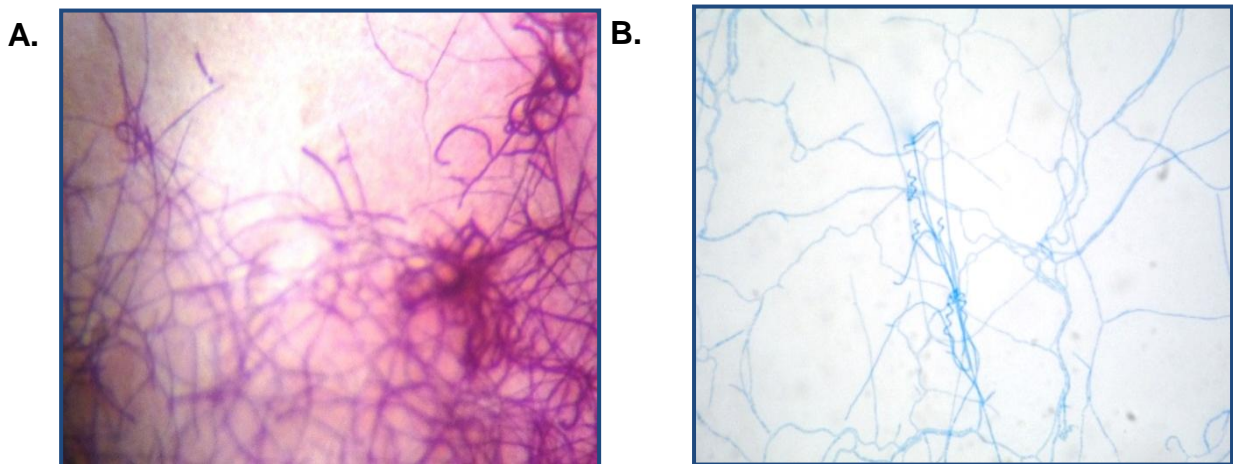
La Figura 11 muestra las colonias de Ac2c, de color beige y blanco para el micelio aéreo, y amarillo oscuro para el micelio vegetativo. Sin embargo estas colonias pareciera que tomaran el color del medio, en el cual se hundían con fuerza, lo que hace más difícil el subcultivo. Eran colonias secas y muy duras, pero el brillo leve se debe a que la superficie era cartilaginosa. Poseían forma molar con margen lobulado y diámetro aproximado de 4 mm. Por otra parte no producían pigmentos difusibles al medio, y se percibía un fuerte olor a suelo húmedo.

Figura 11. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2c en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



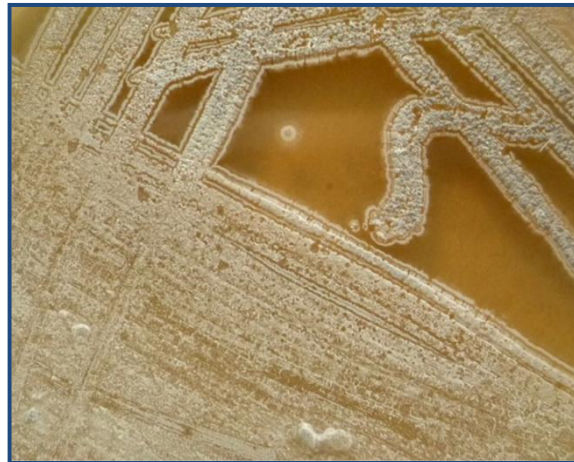
En la Figuras 12A y 12B se observa la morfología microscópica de Ac2c, la cual comprende hifas largas y delgadas, en una red que se desarrolla. Las hifas poseían forma onduladas, ramificadas, y no fragmentadas, y tendían a la formación de bucles.

Figura 12. Tinciones de las colonias de Ac2c con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol



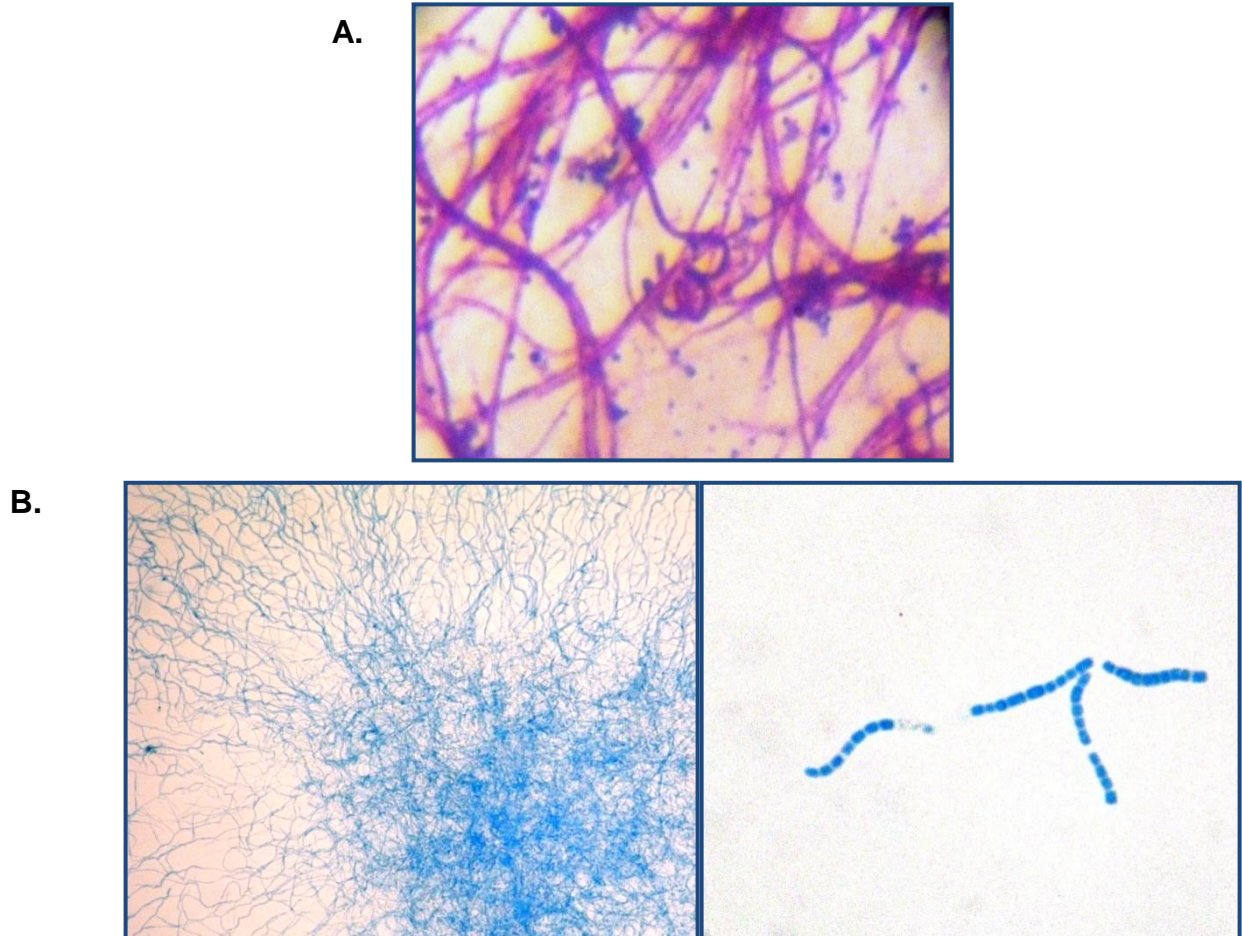
En la Figura 13 se aprecia que las colonias de Ac2d eran de color gris claro en el anverso, y en el reverso, se observan de color beige y con aspecto cuarteado. Las colonias obtenidas eran superficie lanas pulverulenta, con formación de surcos alrededor. Poseían consistencia dura y seca, opacas, con un diámetro aproximado de 4 mm, y tienen forma molar y margen erosionado. No produjeron pigmentos difusibles al medio, pero sí el olor típico de la tierra que compone al suelo, y gotas de exudado, lo que estaría indicando la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Figura 13. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2d en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



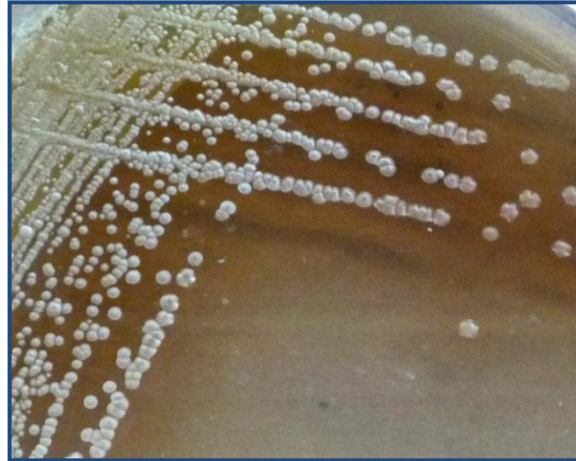
La tinción de Gram de la colonia de Ac2d que se observa en la Figura 14, muestra hifas largas, que al final se enrollan en un bucle perfecto, tal como se describe para los actinomicetos del género *Streptomyces*²⁹. Adicionalmente la tinción con azul de lactofenol permitió observar esporas individuales dispuestas en cadenas cortas, así como hifas onduladas delgadas, con ramificaciones no fragmentadas, que se originan de un centro común, formando la red del micelio.

Figura 14. Tinciones de las colonias de Ac2d con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



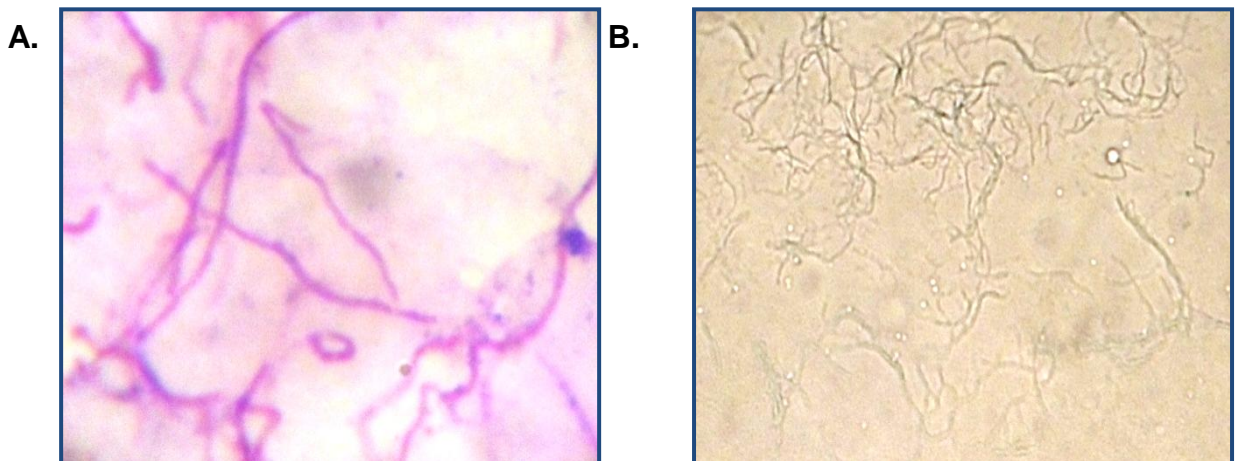
En la Figura 15 se observan las colonias de Ac2e, con micelio aéreo de color blanco y beige, y micelio vegetativo de color café. Por otra parte, la superficie era cartilaginosa, y la forma se asemejaba a la de una flor, con margen ondulado. Eran opacas, de consistencia seca y dura, y producían pigmentos difusibles al medio, oscureciendo las colonias. Una colonia tenía aproximadamente 4 mm y se adhería fuertemente a medio de cultivo sólido.

Figura 15. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2e en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



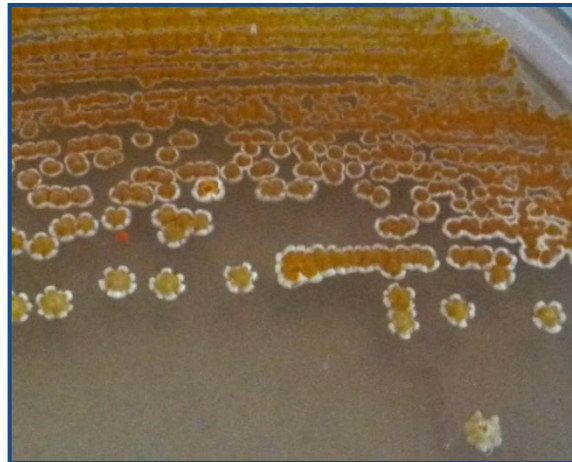
En la Figura 16 se observan las colonias de Ac2e teñidas con los colorantes de la tinción de Gram, y con azul de lactofenol. Las hifas tenían una forma delgada, eran onduladas y no fragmentadas.

Figura 16. Tinciones de las colonias de Ac2e con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



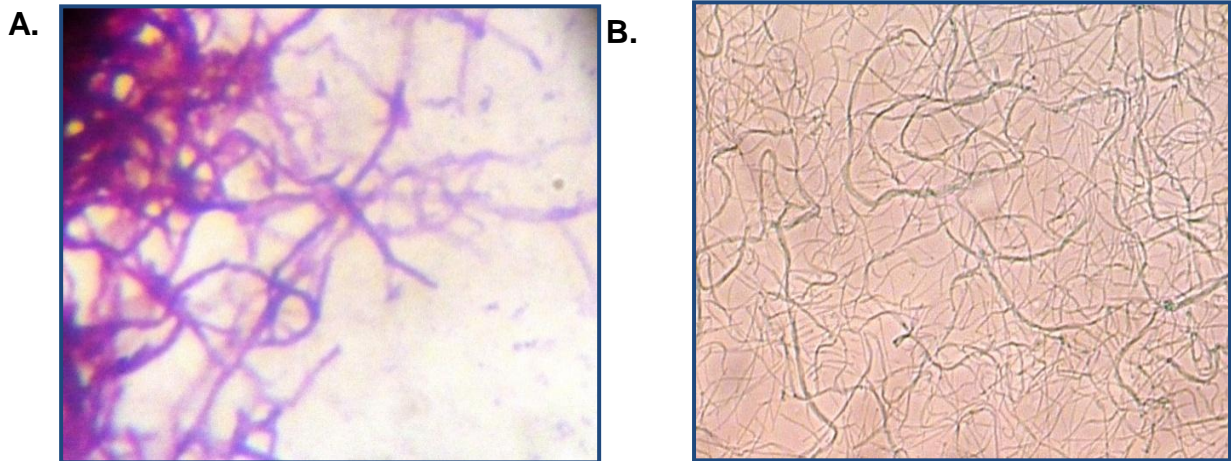
La Figura 17 corresponde a las colonias de Ac2f. Estas presentaron color naranja y amarillo con borde blanco, en el anverso, y de color naranja oscuro en el reverso. La superficie también era cartilaginosa opaca, y la consistencia seca y dura. Cada colonia tenía un diámetro aproximado de 4.5 mm, forma de flor, y margen evidentemente ondulado. No producían pigmentos difusibles al medio, se hundían con fuerza en el medio sólido, observándose un exudado, lo que indicaba su esporulación y producción de metabolitos secundarios.

Figura 17. Morfología macroscópica de las colonias de la cepa Ac2f en medio YME, después de 15 días de incubación a temperatura ambiente.



Mediante la tinción de Gram y con azul de lactofenol (Figura 18), se pudo diferenciar la formación de hifas largas, delgadas, onduladas, con ramificaciones no fragmentadas, formando una red.

Figura 18. Tinciones de las colonias de Ac2f con aumento 100x: A. Gram; B. Azul de lactofenol.



Las siete colonias aisladas presentaron características macro y microscópicas comunes, las cuales se encuentran resumidas en la **Tabla 9**. Las siete presentaron una consistencia seca, y diámetro aproximado entre 4 y 5 mm, e hifas delgadas ramificadas Gram positivas. En el caso de las cepas denominadas Ac1b, Ac2b, Ac2c y Ac2d, se apreciaron las formaciones de cadenas de conidiosporas en espirales. Asimismo en las colonias Ac1b, Ac2b y Ac2f, se observó una secreción, lo cual dio un primer indicio de la capacidad que estas poseen para biosintetizar metabolitos secundarios. Sin embargo, cada una de las siete colonias mostró propiedades únicas, que permitieron distinguirlas entre sí, y se infirió que correspondían a especies diferentes.

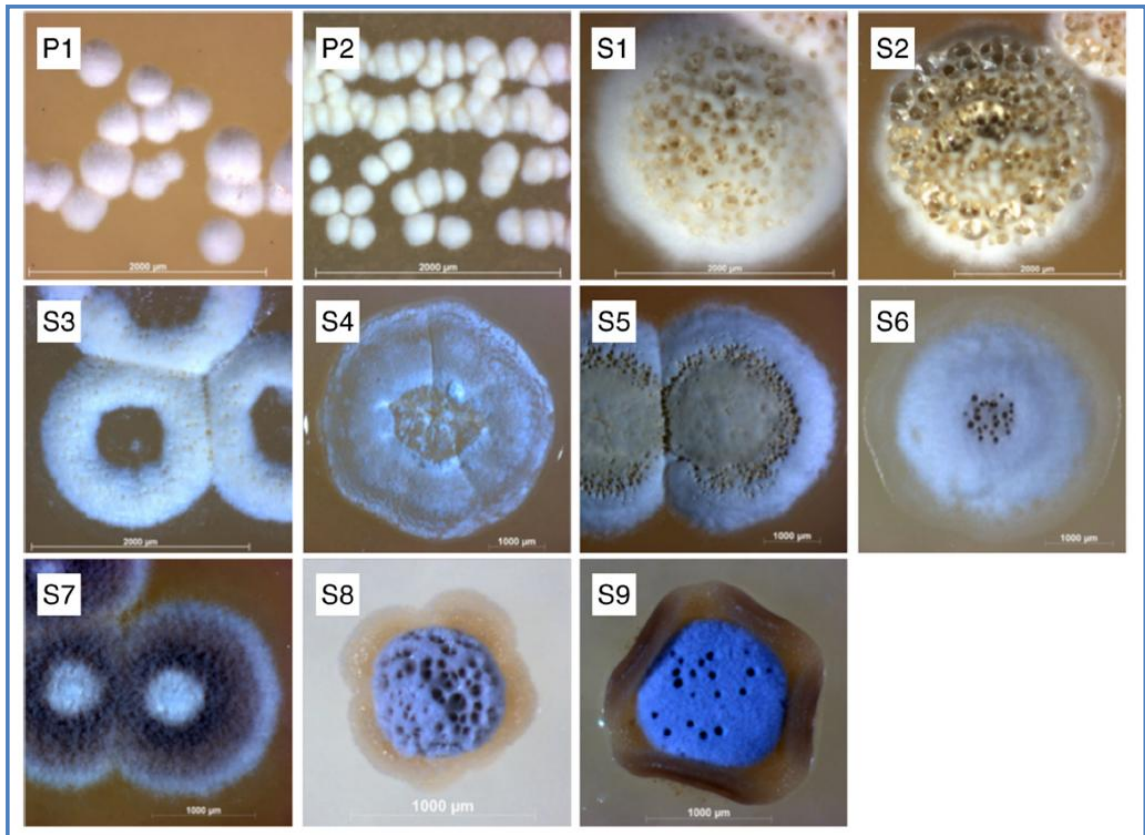
Tabla 9. Comparación de las características morfológicas macro y microscópicas de las cepas aisladas

CARACTERÍSTICAS		Ac1b	Ac2a	Ac2b	Ac2c	Ac2d	Ac2e	Ac2f
Color	Anverso	V-G	B/G	BL/G	B-BL	G	B-BL	N-A
	Reverso	AO	B	AO	AO	B	C	NO
Forma		F	M	F	M	M	FL	FL
Superficie		AT	P	AT	CT	P	CT	CT
Consistencia		SD	SF	SD	SD	SD	SD	SD
Diámetro (mm)		4.0	4.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.5
Pigmentos difusibles		AO	R	AO	NP	NP	NP	NP
Presencia de exudado		(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Tinción de Gram		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Esporas en microcultivo		E	ND	E	E	E	ND	ND

A amarillo; AO amarillo oscuro; B beige; BL blanco; C café; G gris; N anaranjado; NO anaranjado oscuro R rojo; V verde; NP No produce; F filamentosa; FL floral; M molar; AT aterciopelada; CT cartilaginosa; P pulverulenta; SD seca y dura; SF seca y frágil; (+) Positivo; (-) Negativo; E espirales; ND No determinado

En la Figura 19 se observa la morfología macroscópica de algunos de los actinomicetos aislados por Barke y col. (2010), a partir de hormigas cortadoras de hojas de *A. octospinosus*⁵⁰. En las imágenes se ven colonias con características semejantes a las colonias aisladas en este trabajo, como superficies pulverulentas, colonias con surcos alrededor y la presencia de exudado. Es importante mencionar que en el aislamiento a partir de las hormigas de *A. octospinosus*, se emplearon medios de cultivo diferentes a los empleados durante esta investigación, y por consiguiente la morfología se exhibe de manera distinta, ya que ciertamente el desarrollo de los microorganismos depende de las fuentes de carbono y nitrógeno que componen cada medio³¹.

Figura 19. Actinomicetos aislados de hormigas obreras de *A. octospinosus*. Las cepas de *Streptomyces* son numeradas como S1-S9 y las de *Pseudonocardia* como P1-P2. Tomada de Barke y col. (2010)⁵⁰.



Por otra parte, se deduce que los actinomicetos nativos aislados, serían adquiridos por las hormigas obreras al estar en permanente contacto con el suelo durante las actividades de forrajeo, teniendo en cuenta que la muestra de partida para el aislamiento, correspondía al cuerpo entero de las hormigas^{3, 49, 50}.

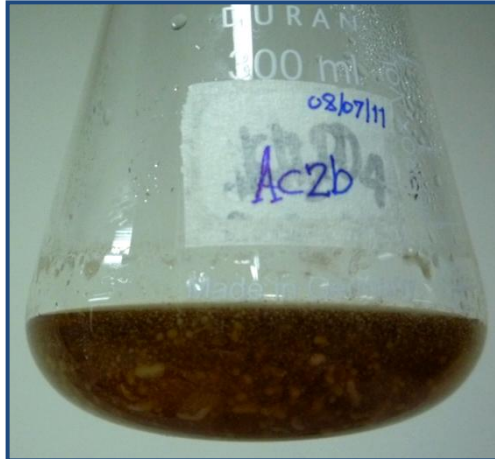
5.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

5.4.1. Aislamiento de ADN genómico de los actinomicetos aislados

Una vez que se aislaron, de forma axénica, las siete colonias de actinomicetos previamente descritas, se inocularon en medio líquido, con el fin de realizar posteriormente la extracción del ADN genómico. Cada colonia fue cultivada en el medio líquido denominado ATCC-2, el cual ha sido referenciado en la literatura^{43, 52} (Anexo A). La incubación se hizo durante tres días con agitación de 150 rpm, a temperatura ambiente (25 – 30°C).

El crecimiento de las siete colonias en el medio ATCC-2, se determinó por la presencia de *pellets* (Figura 20), tal como se ha descrito para este tipo de microorganismos³¹. Debido a que los actinomicetos son bacterias aerobias, la baja concentración de oxígeno en el sistema, condiciona el crecimiento y ocasiona la formación de autoagregación, que sirve como soporte para poder desarrollar los filamentos y esporas⁵⁸. De este modo se obtuvo la suficiente biomasa microbiana, y se completó el aislamiento del ADN de cada colonia, siguiendo el protocolo descrito en el numeral 4.6.1 de la Metodología Experimental.

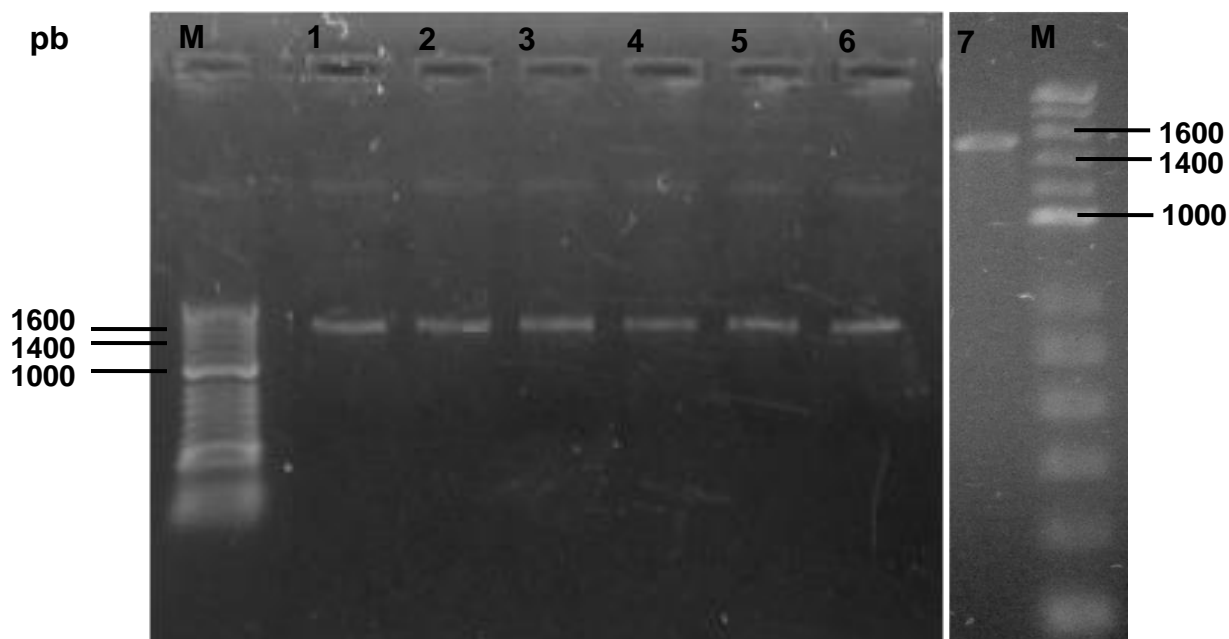
Figura 20. Ejemplo del crecimiento de los actinomicetos aislados, en caldo ATCC-2, por incubación de 3 días, con agitación de 150 rpm y 25 - 30°C.



5.4.2. Amplificación por PCR del ADNr 16S de los actinomicetos aislados

Con el objeto de realizar la identificación molecular de las siete colonias con características macro y microscópicas de actinomicetos, previamente aisladas, se llevó a cabo la amplificación del gen codificante del ARNr 16S de cada una, empleando los *primers* universales 27F y 1492R. Estos se unen a la posición 8-27 y 1492-1513 del gen del ARNr 16S de *E.coli* (*rrnB*, GenBank J01695)⁵⁹ respectivamente, amplificando toda la secuencia del ADNr 16S. De esta manera se generó con cada colonia, un fragmento de alrededor de 1500 pb. (Figura 21).

Figura 21. Gel de agarosa 1.5 % con los productos de la amplificación del ADNr 16S de los actinomicetos nativos. Carriles, M: marcador de peso molecular *Hyperladder II*; 1: Ac1b; 2: Ac2a; 3: Ac2b; 4: Ac2c; 5: Ac2d; 6: Ac2e; 7: Ac2f.



5.4.3. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos aislados

La secuenciación de los ADNr 16S amplificados de las siete colonias aisladas, se llevó a cabo por Macrogen, empleando los dos *primers* 27F y 1492R, para abarcar de manera precisa todo el gen. Por consiguiente se obtuvieron dos secuencias individuales para cada colonia, las cuales fueron ensambladas empleando el *software SeqMan* de *Lasergene 7*. Las secuencias consenso posteriormente se sometieron a un análisis estándar BLAST nucleótido–nucleótido, para hacer la comparación con otras secuencias de la base de datos NCBI, y de este modo identificar a que microorganismo correspondían. Los resultados del análisis se consignan en la Tabla 10.

Teniendo en cuenta que una identidad $\geq 99\%$ es el criterio utilizado para identificar un aislamiento a nivel de especie, y que una identidad de $\geq 97\%$ identifica un organismo a nivel de género⁶⁰, se evidenció que las siete colonias aisladas, corresponden a especies de *Streptomyces*. En el caso de las colonias denominadas como Ac1b, Ac2b, Ac2c y Ac2d, los resultados confirmaron lo señalado a partir de las observaciones morfológicas. Las secuencias de las colonias nativas Ac2e y Ac2f, por ser idénticas en un porcentaje $< 99\%$ con las de las cepas de la bases de datos, podrían considerarse como propias de nuevas especies⁶⁰.

Tabla 10. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias del ADNr 16S de las cepas aisladas de actinomicetos

Cepa nativa	Cepa relacionada/Número GenBank	Identidad, %
Ac1b	<i>Streptomyces chartreusis</i> /AJ399468.1	100
Ac2a	<i>Streptomyces</i> sp. BS11/HM057832.1	99
Ac2b	<i>Streptomyces</i> sp. IR027-SDHV6/AB572860.1	99
Ac2c	<i>Streptomyces gelaticus</i> /EU741111.1	99
Ac2d	<i>Streptomyces</i> sp. 1356/EU864308.1	99
Ac2e	<i>Streptomyces triostinicus</i> /AB184519.1	98
Ac2f	<i>Streptomyces seoulensis</i> /EU595010.1	97

La mayoría de las cepas de *Streptomyces* spp., correspondientes a las colonias nativas aisladas, se han descrito previamente como productoras de diversos metabolitos secundarios con actividad biológica.

Por ejemplo, se ha demostrado que el agente antitumoral chartreusina, conocido también como lambdamicina, ha sido aislado de *S. chartreusis*, el cual se relaciona con la colonia nativa Ac1b, identificada como la cepa ISP 5085. La chartreusina es un policétido aromático, biosintetizado por policétido sintasas Tipo II, que posee una actividad quimioterapéutica significativa contra varias líneas celulares tumorales⁶¹. Por otra parte, recientemente se ha caracterizado un *clúster* biosintético del poliéter calcimicina, de la cepa *S. chartreusis* NRRL 3882, del cual hacen parte genes que codifican policétido sintasas modulares Tipo I. La calcimicina inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunos hongos, y es ampliamente utilizada como herramienta bioquímica en estudios farmacológicos. Los compuestos antibióticos X-14885A y cezomicina, estructuralmente similares a la calcimicina, también son producidos por cepas de *S. chartreusis*⁶².

En relación con la colonia Ac2b, identificada como *S. Streptomyces* sp. IR027-SDHV6, en el año 2010, se publicó el aislamiento de un macrólido, análogo de bafilomicina, denominado JBIR-100, a partir de esta nueva cepa aislada del suelo en Japón. Se observó que el compuesto JBIR-100 sirve como inhibidor de ATPasas del tipo vacuolar, cuyo mal funcionamiento ocasiona enfermedades como osteopetrosis, infertilidad en los hombres y acidosis renal⁶³.

Por otra parte *S. gelaticus*, correspondiente a la colonia nativa Ac2c, produce elaiomicina, un compuesto azoxi con actividad antibiótica⁶⁴. Asimismo *S. triostinicus*, asignado a la colonia Ac2e, produce principalmente los antibióticos triostina A y equinomicina, los cuales son del tipo quinomicina, conocidos por su amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo propiedades antitumorales. Estos son biosintetizados por péptidosintetasas no ribosomales (NRPS)⁶⁵, pero del mismo modo una PKS-I de *S. triostinicus* ha sido previamente descrita (GenBank AB431386.1). Adicionalmente, se ha publicado la producción de actinomicina V, un agente antitumoral que inhibe la formación de células de

leucemia, por *S. triostinicus* sp.⁶⁶, y el antibiótico quinoxalina⁶⁷. En la India fue aislada del suelo también una nueva cepa de *S. triostinicus*, comprobándose sus actividades antibacteriales y antifúngicas⁶⁷.

Se identificó la secuencia de *S. seoulensis* DA07118, relacionada con la colonia Ac2f, la cual fue identificada al evaluar actinomicetos con actividad nematocida (GenBank: EU595010.1). Sin embargo estos datos aún no están publicados.

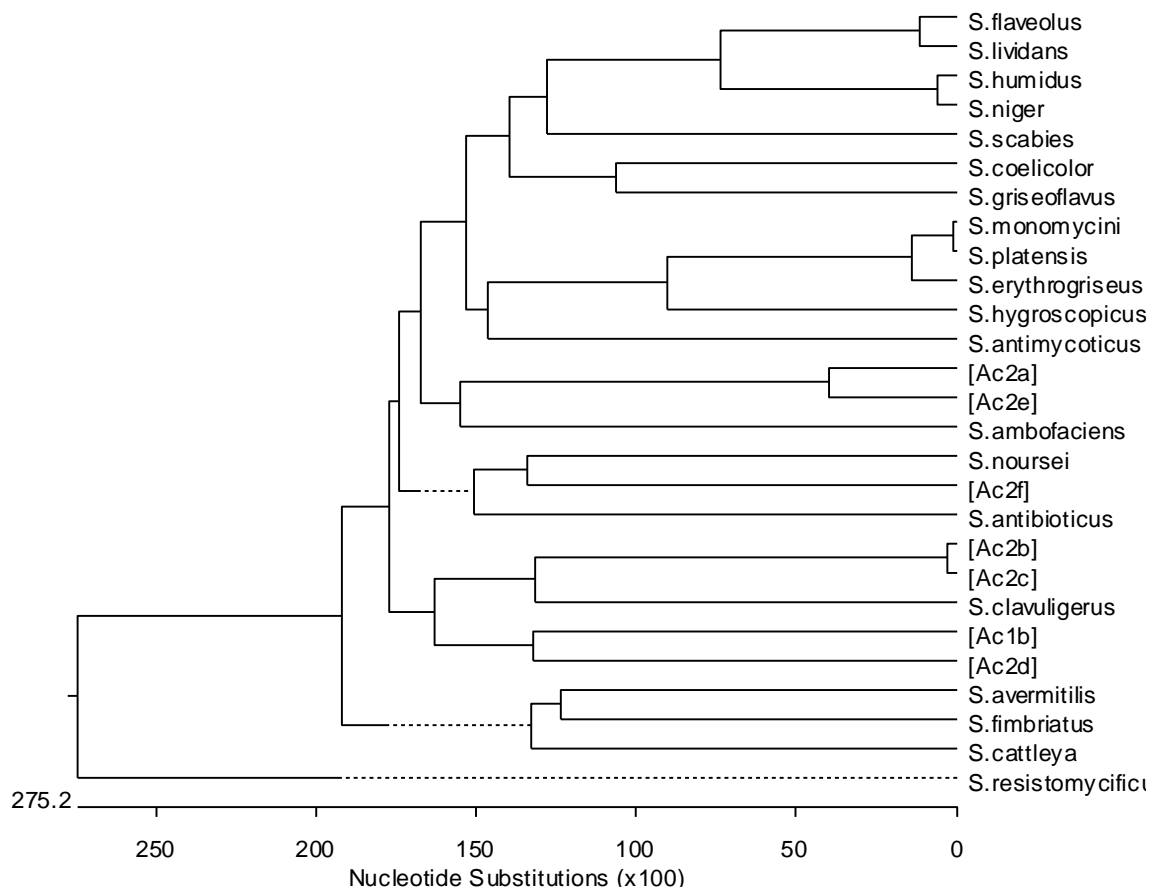
Por otro lado, no se encuentran reportes sobre el estudio de la actividad biológica de las cepas *Streptomyces* sp. BS11 y *Streptomyces* sp. 1356, relacionadas con las colonias nativas Ac2a y Ac2d, respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir del análisis BLASTN, se corroboraron mediante el análisis filogenético de las cepas aisladas, a partir de la construcción de un árbol filogenético utilizando en *software MegAlign* de *Lasergene*. Se usaron las secuencias completas y/o parciales del ADNr 16S de *Streptomyces* spp. (Figura 22) y *Nocardia* spp. (Figura 23), tomadas de la base de datos NCBI. Los números de acceso del GenBank se especifican en el Anexo C.

Al hacer la comparación con las cepas de *Streptomyces* spp, se observó que los siete actinomicetos nativos (indicados en corchetes), pertenecían a un mismo grupo, que a su vez incluía la mayoría de las cepas de referencia, evidenciando su estrecha relación taxonómica con las especies de este género. Las cepas *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6 (colonia Ac2b) y *S. gelaticus* (colonia Ac2c), las cuales presentaron gran similitud entre ellas, se relacionan con la cepa *S. clavuligerus* (GenBank AB045869.1); *S. chartreusis* ISP 5085 (colonia Ac1b) y *Streptomyces* sp. 1356 (colonia Ac2d), que se asemejan entre sí, se agrupan con las primeras, en un solo brazo del árbol filogenético. Por su parte, las tres cepas aisladas restantes se asocian en otro grupo; *S. seoulensis* DA07118 (colonia Ac2f) presenta gran similitud con *S. noursei* (GenBank AY999827.1), y estas a su vez

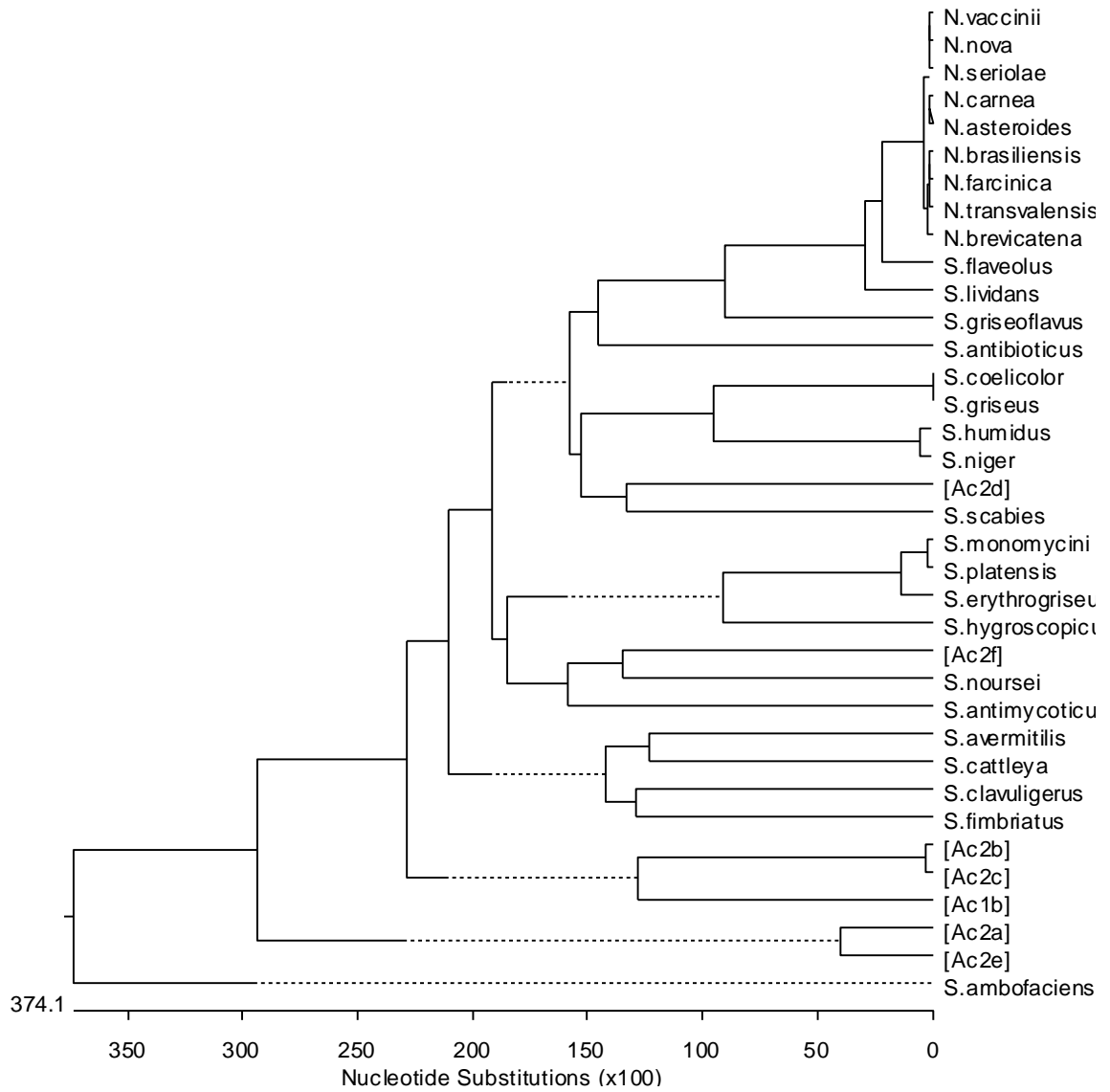
con *S. antibioticus* (GenBank NR043348.1), mientras *Streptomyces* sp. BS11 (colonia Ac2a) y *S. triostinicus* (colonia Ac2e), a la misma distancia, se corresponden con *S. ambofaciens* (GenBank AB184465.1).

Figura 22. Árbol filogenético construido con las cepas nativas y cepas de *Streptomyces* spp. de la base de datos NCBI.



Asimismo la comparación con actinomicetos del género *Nocardia*, indica que las colonias de actinomicetos aisladas se reúnen en un brazo diferente en el árbol filogenético, probando de esta manera su identidad con el género *Streptomyces*.

Figura 23. Árbol filogenético construido con las cepas nativas, cepas de *Streptomyces* spp. y *Nocardia* spp. de la base de datos NCBI.



5.5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE PKS-I DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS

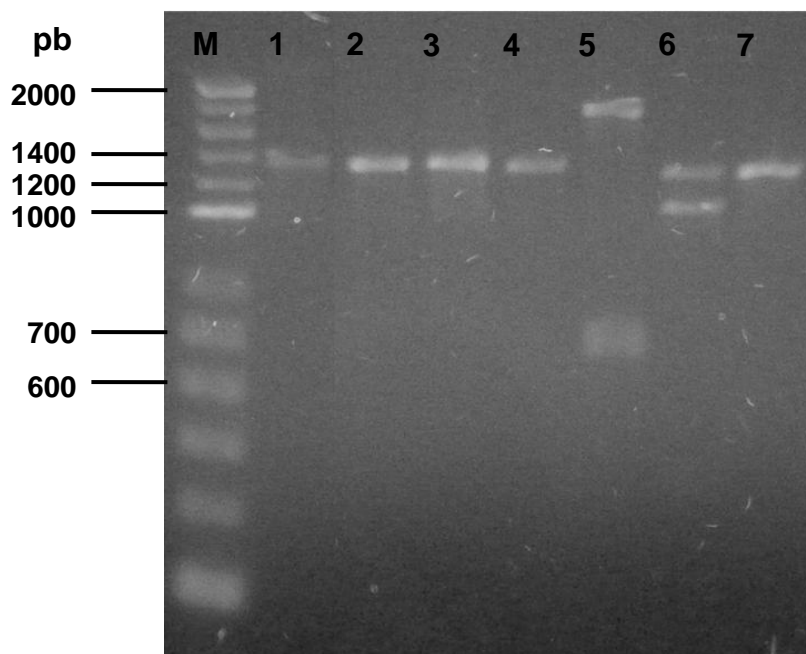
5.5.1. Amplificación por PCR de genes de PKS-I de los actinomicetos aislados

La amplificación de genes de PKS-I, a partir del ADN genómico de cada uno de los actinomicetos nativos, se realizó empleando los *primers* degenerados K1F y M6R. La pareja de *primers* se diseñó para amplificar los dominios KS y metilmalonil-CoA transferasa de PKS-I, respectivamente⁴³.

Al revelar el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, con los productos de la amplificación, se observaron las bandas del tamaño esperado (1200 - 1400 pb)⁴³, para la cepa control *S. clavuligerus* ATCC 27064, y para las cepas identificadas previamente como *S. chartreusis* ISP 5085, *Streptomyces* sp. BS11, *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6, *S. triostinicus* y *S. seoulensis* DA07118. Así se evidenció su potencial como productores de metabolitos secundarios del tipo policétido (Figura 24).

S. clavuligerus es el actinomiceto más importante desde el punto de vista industrial, ya que produce variedad de compuestos β -lactámicos, útiles clínicamente, entre los que se incluyen los antibióticos cefamicina C y el ácido clavulánico. Además, se han descrito otros tres antibióticos, entre los que se incluye un macrólido similar al inmunosupresor tacrolimus, en cuya biosíntesis está implicado un *clúster* de genes de PKS de once módulos. En total, se han descrito ocho *clústeres* putativos de genes de PKS para *S. clavuligerus* ATCC 27064⁶⁸, por lo cual se usó como control positivo de la amplificación de genes de PKS-I.

Figura 24. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación de genes de PKS-I de los actinomicetos nativos. Carriles, M: marcador de peso molecular *Hyperladder II*; 1: *S. clavuligerus*; 2: *S. chartreusis* ISP 5085 (Ac1b); 3: *Streptomyces* sp. BS11 (Ac2a); 4: *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6 (Ac2b); 5: *Streptomyces* sp. 1356 (Ac2d); 6: *S. triostinicus* (Ac2e); 7: *S. seoulensis* DA07118 (Ac2f).



En el caso de la cepa identificada como *Streptomyces* sp. 1356, se amplificaron dos bandas de aproximadamente 1900 y 700 pb respectivamente. Los tamaños de todos los fragmentos amplificados fueron estimados con el *software* *Quantity One*, tomando como patrón las bandas del marcador de peso molecular *Hyperladder II* (50 – 2000 pb) (Tabla 11).

El fragmento de 700 pb, puede estar relacionado con el dominio β -cetoacil sintasa, como se ha reportado en otros estudios³⁵, y por este motivo se puede inferir que *Streptomyces* sp. 1356 también podría producir compuestos del tipo policétido.

Tabla 11. Tamaños bandas amplificadas con los *primers* K1F/M6R

	Cepas aisladas	Tamaño fragmento (pb)
Control:	<i>S. clavuligerus</i>	1359.29
Ac1b:	<i>S. chartreusis</i> ISP 5085	1369.22
Ac2a:	<i>Streptomyces</i> sp. BS11	1379.29
Ac2b:	<i>Streptomyces</i> sp. IR027-SDHV6	1358.25
Ac2d:	<i>Streptomyces</i> sp. 1356	1903.88 – 732.26
Ac2e:	<i>S. triostinicus</i>	1323.12 – 1067.43
Ac2f:	<i>S. seoulensis</i> DA07118	1331.40

La amplificación de más de un fragmento de ADN para una sola muestra, se debe a que los *primers* K1F/M6R son degenerados y fueron diseñados para amplificar genes similares, pero no idénticos, por lo cual su especificidad es menor respecto a la de otros pares de *primers*. Además, debido a que en la organización modular de los genes de las PKS-I se repiten dominios⁴¹, y que las cepas de actinomicetos poseen más de un *clúster* de genes de PKS³⁵, los productos de la PCR pueden ser mezclas de secuencias codificantes para los dominios de interés.

Por otro lado, la colonia identificada como *S. gelaticus* (Ac2c), no produjo ninguna banda, como resultado de la amplificación con K1F/M6R. La biosíntesis de elaiomicina relacionada con este microorganismo, no se lleva a cabo por PKS-I⁶⁴, y por tal razón, no posee los dominios KS y AT. Este resultado ratifica la identidad de Ac2c, y se considera que aunque no posea el potencial para producir compuestos policétidos, se debe probar su actividad contra diferentes bacterias u hongos, con el fin de investigar si puede producir otras sustancias similares a la elaiomicina.

5.5.2. Secuenciación de los genes de PKS-I identificados en los actinomicetos aislados

De igual forma, en MacroGen se hizo la secuenciación de los genes de PKS-I amplificados. Las secuencias consenso, obtenidas con el *software SeqMan*, se sometieron al análisis estándar BLAST nucleótido–nucleótido, con lo que se identificaron tres *clústeres* biosintéticos relacionados con las cepas nativas denominadas como Ac1b, Ac2a y Ac2b, relacionadas con *S. chartreusis* ISP 5085, *Streptomyces* sp. BS11 y *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6, respectivamente (Tabla 12).

Los resultados obtenidos del análisis BLASTN son satisfactorios, puesto que los porcentajes de identidad demuestran que las secuencias de los nucleótidos de los genes amplificados, poseen similitud con *clústeres* implicados en la biosíntesis de antibióticos policétidos ya caracterizados.

Tabla 12. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias de genes de PKS-I de las cepas aisladas de actinomicetos

Cepa nativa	Clúster biosintético relacionado/ Número GenBank	Identidad, %
Ac1b	Policétido-2 de <i>S. avermitilis</i> /AB070942.1	85
Ac2a	Anfotericina de <i>S. nodosus</i> /AF357202.1	82
Ac2b	Concanamicina A de <i>S. neyagawaensis</i> / DQ149987.	82

Las secuencias de los genes de PKS-I amplificados, correspondientes a las demás cepas nativas, no se ensamblaron. En el caso de las cepas *Streptomyces* sp. 1356 (Ac2d) y *S. triostinicus* (Ac2e), debido a que en los productos de la PCR están mezclados los dos fragmentos de ADN amplificados que se observaron con la electroforesis, y seguramente se solaparon las señales en el momento de realizar la secuenciación. De este modo, se dificultó la determinación precisa de los nucleótidos que conforman las secuencias individuales, que se obtienen con cada *primer* y no se lograron ensamblar.

Adicionalmente, con el fin de la confirmar la función policétido sintasa determinada para cada una de las tres cepas nativas, denominadas como Ac1a, Ac2a y Ac2b, se identificaron los marcos de lectura abiertos (ORFs) relacionados con las secuencias obtenidas de los genes identificados, utilizando el buscador de ORF de NCBI. Estos se analizaron con BLASTP.

Estas comparaciones demostraron que el gen amplificado a partir de *S. chartreusis* ISP 5085, se relaciona en un 80%, tanto con la policétido sintasa putativa de *S. lasaliensis* (GenBank BAG85027.1) como con la policétido sintasa modular relacionada con el antibiótico lasalocid (GenBank CAQ64687.1), aislada de la misma especie. Los genes amplificados de *Streptomyces* sp. BS11 y *Streptomyces* sp. IR027-SDHV6, se relacionan en un 99% con la proteína AmphI de *S. nodosus* (GenBank AAK73501.1), y con una policétido sintasa de *S. platensis* (GenBank BAH02268.1), respectivamente; AmphI está involucrada en la biosíntesis de Anfotericina⁶⁹, y la PKS de *S. platensis*, en la biosíntesis de pladienolide, un macrólido antitumoral⁷⁰.

Aunque la relación entre los genes identificados y las proteínas mencionadas es bastante significativa, el hecho de que las cepas nativas aisladas correspondan a especies de *Streptomyces* diferentes a *S. lasaliensis*, *S. nodosus* y *S. platensis*, permite la hipótesis de que los genes caracterizados corresponden posiblemente a

nuevas policétidos sintasas, y por tanto podrían estar involucradas en la biosíntesis de compuestos del tipo policétido con estructuras químicas diferentes a las conocidas actualmente.

Igualmente estos resultados reafirman que las cepas nativas aisladas en este trabajo poseen un alto potencial como productoras de compuestos policétidos con actividad biológica.

6. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Resultados parciales obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron expuestos a la comunidad científica en el 43rd *IUPAC World Chemistry Congress*, realizado en el marco de la celebración del Año Internacional de la Química, en el municipio de San Juan Bautista, ciudad capital de Puerto Rico, del 30 de Julio al 7 de Agosto de 2011. El trabajo se expuso en la modalidad de póster con el título: “PRELIMINARY ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYPE I PKS GENES IN ACTINOMYCETES ISOLATED FROM LEAF CUTTER ANTS *Atta cephalotes*”.

CONCLUSIONES

1. La presencia de actinomicetos en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes*, recolectadas en los terrenos de la Universidad Industrial de Santander, se comprobó con el aislamiento de siete cepas nativas.
2. Las características morfológicas macro y microscópicas, y las secuencias del ADNr 16S, permitieron clasificar a las cepas nativas aisladas, como especies del género *Streptomyces*.
3. El uso de la pareja de *primers* K1F/M6R fue adecuado para la identificación de genes de policétido sintasas Tipo I, porque se amplificaron en seis de las siete cepas nativas, indicando su potencial como productoras de compuestos policétidos.
4. La caracterización de tres secuencias diferentes de genes de policétido sintasas Tipo I, correspondientes a las cepas nativas denominadas como Ac1b, Ac2a y Ac2b, corroboran que estas son una posible fuente de nuevos compuestos policétidos con actividad biológica.
5. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, corroboran la diversidad entre los actinomicetos, y de los genes de policétido sintasas Tipo I relacionados.

RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo la amplificación por PCR de las cepas nativas denominadas como Ac2e y Ac2f, con *primers* específicos para actinomicetos, con el fin de identificarlas a nivel de especie.
- Comprobar la actividad biológica de las siete cepas nativas de estreptomicetos aisladas, contra diferentes bacterias, hongos y levaduras mediante ensayos de difusión de disco.
- Determinar la producción de metabolitos secundarios mediante la fermentación de las siete cepas nativas de estreptomicetos aislados, en medios de cultivo líquido.
- Estudios adicionales se requieren para comprender y explicar la ecología de las hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes*. Este trabajo sirve como punto de partida para dichos análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Currie CR., Scott JA., Summerbell RC., Malloch D. Fungus growing ants uses antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*. 1999; 398: 701-704.
2. Mackay W., Mackay E. Las hormigas de Colombia: Arrieras del género *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 1986; 12:23-30.
3. Haeder S., Wirth R., Herz H., Spiteller D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *PNAS*. 2009; 106: 4742 – 4746.
4. Busti E., Monciardini P., Cavaletti L., Bamonte R., Lazzarini A., Sosio M., Donadio S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*. 2006; 152: 675 – 683.
5. Vittar F. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de la Mesopotamia Argentina. *Miscelánea INSUGEO*. 2008; 17: 447-466.
6. Schultz, TR. In search of ant ancestors. *PNAS*. 2000; 97:14028-14029.
7. Fernández F. and Sendoya S. Synonymic list of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biota Colombiana*. 2004; 5:3-105.
8. Schultz, TR. Ants, plants and antibiotics. *Nature*. 1999; 398:747-748.
9. Fernández F. (ed). *Introducción a las hormigas de la Región Neotropical*. Bogotá, Colombia, 2003.

10. Klaus J. Encyclopedia of Entomology, Springer Science; 2008. Part 12. p. 2151-2158.
11. Keller L., Gordon E. The Lives of Ants. Oxford University Press Inc., New York, United States, 2009.p.129 – 133.
12. Vo T., Mueller U., Mikhevey A. Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). Mycologia. 2009; 101:206-210.
13. Montoya J., Chacón P., Manzano M. Caracterización de nidos de la hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) en Cali (Colombia). Rev. Colombiana de Entomología. 2006; 32:151-158.
14. Zientz E., Feldhaar H., Stoll S., Gross R. Insights into the microbial world associated with ants. Arch Microbiol. 2005; 184: 199-206.
15. Rodríguez J., Calle Z., Montoya J. Herbívora de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) sobre tres sustratos vegetales. Rev. Colombiana de Entomología. 2008; 34:156-162.
16. Currie C.R., Mueller U.G., Malloch D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 1998-8002.
17. Currie C.R., Stuart A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. Proc R Soc Lond Ser B. 2001; 268: 1033-1039.
18. Gerstner A.T, Poulsen M., Currie C.R. Recruitment of minor workers for defense against a specialized parasite of *Atta* leaf-cutting ant fungus gardens. Ethology, Ecology and Evolution. 2011; 23: 61-75.

19. Fernández H., Zimmerman J.K., Rehner S.A., Wcislo W.T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc R Soc Lond Ser B*. 2006; 273: 1689-1695.
20. Ortius-Lechner D., Maile R., Morgan ED., Boomsma JJ. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: New compounds and their functional significance. *J Chem Ecol*. 2000; 26:1667–1683.
21. De Lima Mendonça A., da Silva C.E., de Mesquita F.L., da Silva Campos R., Do Nascimento R.R., de Azevedo Ximenes E.C., Sant'Ana A.E. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009; 95: 295-303.
22. Zhang MM., Poulsen M., Currie CR. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *ISME J*. 2007; 1:313–320.
23. Cafaro MJ., Currie CR. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Can. J. Microbiol*. 2005; 51: 441–446.
24. Kost C., Lakatos T., Böttcher I., Arendholz W-R., Redenbach M., Wirth R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*. 2007; 94: 821–828.
25. Mueller U., Dash D., Rabeling C., Rodrigues A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution*. 2008; 62:2894–2912.

26. Poulsen M., Bot A.N.M., Boomsma JJ. The effect of metapleural gland secretion on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leaf-cutting ants. *Naturwissenschaften*. 2003; 90: 406-409.
27. Currie CR., Poulsen M., Mendenhall J., Boomsma JJ., Billen J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*. 2006; 311: 81 - 83.
28. Giraldo E. C., Montoya-Lerna J., Betancur J., Calle Z., Armbrecht I. Microbiota asociada a la casta obrera de *Atta Cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) y su funcionalidad ecológica. Resúmenes XXXV Congreso SOCOLEN. 2008; p206.
29. Meyer S.T., Leal I.R, Tabarelli M., Wirth R. Ecosystem engineering by leaf-cutting ants: nests of *Atta cephalotes* drastically alter forest structure and microclimate. *Ecological Entomology*. 2011; 36:14 - 24.
30. Ricci M., Benitez D., Padin S., Maceiras A. Hormigas Argentinas: Comportamiento, distribución y control. 2005. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
31. Correa, M. S. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. 2008. [Tesis doctoral]. Departamento de Microbiología del Suelo y sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín y Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.
32. González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005; 54: 401-415.

33. Coyne, M. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Paraninfo S. A. 2000. p. 92 – 99.
34. Leiva S., Yáñez M., Zaror L., Rodríguez H., García-Quintana H. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. Rev Méd Chile. 2004; 142: 151 – 159.
35. Hakvåg S., Fjærvik E., Josefsen K., Ian E., Ellingsen T., Zotchev S. Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. Marine Drugs. 2008; 6: 620-635.
36. Kennedy J., Baker P., Piper C., Cotter P.D., Walsh M., Mooij M.J., et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. Mar Biotechnol. 2009; 11: 384-396.
37. Bergey J., Hendricks D. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. William & Wilkins Ed. 1974.
38. Prescott, L. Microbiología. Quinta Edición. McGraw-Hill-Interamericana. 2004.
39. Stackebrandt E., Schuman P. "Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria". In: Dworkin M., Falkow S., et al. (Eds.) The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria. 3rd Ed. Springer. 2006; 3:297-321.
40. Rodicio M.R., Mendoza M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22: 238-245.

41. Sanz A. Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp. 2005. [Tesis doctoral] Universidad de Alcalá, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
42. De Heredia M.F. Análisis molecular de una nueva poliquétido sintetasa en *Streptomyces antibioticus*. 1993. [Trabajo de doctorado]. Universidad Complutense de Madrid.
43. Ayuso – Sacido A., Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology* 2004; 49: 10 – 24.
44. Baerson S.R., Rimando A.M. Chapter 1 - A Plethora of Polyketides: Structures, Biological Activities and Enzymes. ACS. 2007.
45. Bervanakis G. Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria. 2008. [Master's thesis]. Flinders University. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Faculty of Health Sciences.
46. Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003; 7: 285-295.
47. Oh D.C., Poulsen M., Currie C.M., Clardy J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nature Chemical Biology*. 2009; 5: 391-393.

48. Sánchez-Peña S.R., Sánchez-Ovalle M.R., Gallegos-Morales G., Sánchez - Arizpe A. *In vitro* antagonism of Actinomycetes isolated from fungus-growing ants against plant pathogenic fungi. *Phytoparasitica*. 2008; 36:322-325.
49. Zucchi T. D., Guidolin A.S., Cônsoli F.L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiol Res*. 2011;166: 68-76.
50. Barke J., Seipke R.F., Grünschow S., Heavens D., Drou N., Bibb M., et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*. 2010; 8: 109 – 119.
51. Sen R., Heather I., Estrada D., Doowd S., Hong E., Mueller U. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *PNAS*. 2009; 106: 17805 – 17810.
52. Ayuso A., Clark D., Gonzalez I., Salazar O., Andreson A., Genilloud O. A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 67: 795 – 806.
53. Savic M., Vasiljevic B. Targeting polyketide gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. *J Ind Microbiol Biothechnol*. 2006; 33: 423 – 430.
54. Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996; 16: 313-340.
55. Pinto S., Mann M.B., Campos F. S., Franco A.C., Germani J.C., Van Der Sand S. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a

- composting process and their antimicrobial potential. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26: 1847 – 1856.
56. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. *Practical Streptomyces Genetics.* John Innes Foundation. 2000.
57. Koneman G., D. Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. *Diagnóstico Microbiológico.* Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición. 1999. p. 968 – 970.
58. Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology Advances.* 2004; 22: 189 – 259.
59. Monciardini P., Sosio M., Cavaletti L., Chiocchini C., Donadio S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology.* 2002; 42: 419 – 429.
60. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentified bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000; 38: 3623 – 3630.
61. Xu Z., Jakobi K., Welzel K., Hertweck C. Biosynthesis of the antitumor agent chartreusin involves the oxidative rearrangement of an anthracyclic polyketide. *Chemistry and Biology.* 2005; 12: 579 – 588.
62. Wu Q., Liang J., Lin S., Zhou X., Bai L., Deng Z., et al. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011; 55: 974 - 982.

63. Ueda J., Hashimoto J., Yamamura H., Hayakawa M., Takagi M., Shin-ya K. A new 16-membered tetraene macrolide JBIR-100 from a newly identified *Streptomyces* species. *The Journal of Antibiotics*. 2010; 63: 627 – 629.
64. Mueller J.V. Investigations of elaiomycin. 1984. [Doctoral thesis]. Rice University. University Microfilms International.
65. Praseuth A.P., Wang C., Watanabe K., Hotta K., Oguri H., Oikawa H. Complete sequence of biosynthetic gene cluster responsible for producing triostin A and evaluation of quinomycin-type antibiotics from *Streptomyces triostinicus*. *Biotechnol Prog*. 2008; 24: 1226 – 1231.
66. Singh V., Khan M., Khan S. Tripathi C.K.M. Optimization of actinomicyn V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 82: 379 – 385.
67. Singh V., Praveen V., Khan F., Tripathi C.K.M. Phylogenetics of an antibiotic *Streptomyces* strain isolates from soil. *Bioinformation*. 2009; 4: 53 - 58.
68. Medema M., Trefzer A., Kovalchuk A., van den Berg M., Müller U., Hiejne W., et al. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biology and Evolution*. 2010; 2: 212 - 224.
69. Lynch S., Flood E., Finnan S., Oliynyk M. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol*. 2001; 8:713-23.
70. Machida K., Arisawa A., Takeda S., Tsuchida T., Aritoku Y., Yoshida M., Ikeda H. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor

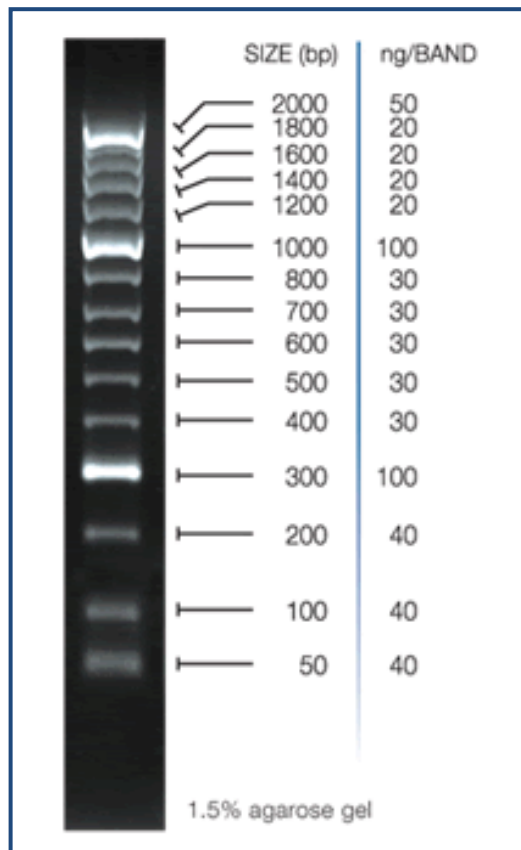
macrolide, pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. Biosci Biotechnol Biochem. 2008; 72:2946-2952.

ANEXOS

Anexo A. Composición de los medios de cultivo

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTE	g/L
Agar Extracto de levadura - Extracto de malta (YME o ISP2)	Extracto de levadura	4
	Extracto de malta	10
	Glucosa	4
	Agar-agar	15
	pH 7.2	
Czapek	KCl	0.5
	K ₂ PO ₄	1.0
	NaNO ₃	2.0
	Sacarosa	3.0
	FeSO ₄	0.01
	MgSO ₄	0.5
	Agar-agar	15
	pH 7.3	
Agar Almidón-Caseína (CS)	Almidón	10
	Caseína	0.3
	NaCl	1.25
	KNO ₃	1.25
	FeSO ₄	0.01
	MgSO ₄	0.5
	CaCO ₃	0.02
	Agar-agar	15
pH 7.0		
Agar Papa Dextrosa (PDA)	Extracto de papa	4
	Glucosa	20
	Agar-agar	15
	pH 5.6	
Caldo ATCC2	Extracto de levadura	5
	Extracto de carne	3
	Peptona	5
	Glucosa	1
	Almidón de papa	2
	Caseína hidrolizada	5

Anexo B. Marcador de peso molecular *Hyperladder II* (Bioline)



Consiste en quince bandas de DNA mostrando rangos de 50 a 2000 pb. Puede ser usado para análisis de cuantificación.

Anexo C. Números de acceso del GenBank de las secuencias del ADNR 16s de cepas de la base de datos NCBI

CEPA	NÚMEROS DE ACCESO
<i>S. ambofaciens</i> NBRC 13685	AB184465.1
<i>S. antibioticus</i> NRRL B-1701	NR043348.1
<i>S. antimycoticus</i> NBRC 12839	NR041080.1
<i>S. avermitilis</i>	AF145223.1
<i>S. clavuligerus</i>	AB045869.1
<i>S. coelicolor</i> DSM 40682	Z76698.1
<i>S. erythrogriseus</i> LMG 19406	NR042294.1
<i>S. fimbriatus</i>	AB045868.1
<i>S. flaevolus</i> NBRC 3715	AB184786.1
<i>S. griseoflavus</i> LMG 19344	NR042291.1
<i>S. humidus</i> NBRC 12877	AB184213.1
<i>S. hygrosopicus subsp. angustmyceticus</i>	AB184817.1
<i>S. lividans</i> NBRC 15680	AB184695.1
<i>S. monomycini</i> NBRC 100769	AB249936.1
<i>S. niger</i> DSM 43049	NR025619.1
<i>S. noursei</i> KCTC 1083	AY999827.1
<i>S. platensis</i>	AB163439.1
<i>S. resistomycificus</i> DSM 40133	AJ310926.1
<i>S. scabies</i> DNK-G01	AB026214.1
<i>N. asteroides</i>	Z36934.1
<i>N. brasiliensis</i>	Z36935.1
<i>N. brevicatena</i>	Z36928.1
<i>N. carnea</i>	Z36929.1
<i>N. farcinica</i>	Z36936.1
<i>N. nova</i>	Z36930.1
<i>N. seriolae</i>	Z36925.1
<i>N. transvalensis</i>	Z36926.1
<i>N. vaccinii</i>	Z36927.1