

INFORME FINAL DE PROYECTO

**Evaluación de Microorganismos con Actividad Antimicrobiana
Asociados a adultos de Avispas Sociales (Hymenoptera:
Vespidae; Polistinae, Epiponini)**

Período de ejecución 01/01/2019- 01/07/2021

Escuela de Biología
Centro de Investigación en Biotecnología

Autores:

PhD. Laura Chavarría Pizarro
PhD. William Rivera Méndez
MSc. William Watson Guido

Setiembre 2021

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Resumen | 1 |
| I. Introducción | 2 |
| II. Marco teórico | 4 |
| Importancia de los Insectos Sociales como Fuente de Nuevos Antibióticos | 4 |
| Actinobacterias | 8 |
| Aspectos generales sobre la clasificación de las avispas de la tribu Epiponi | 9 |
| III. Metodología | 11 |
| i. Aislamiento de actinobacterias de los nidos de avispas sociales..... | 11 |
| a. Recolecta de nidos de avispas..... | 11 |
| b. Aislamiento de microorganismos productores de antibióticos..... | 14 |
| ii. Identificación molecular de los microorganismos productores de antibióticos..... | 15 |
| iii. Determinación de la actividad antibacteriana de las cepas obtenidas de los nidos de avispas | 16 |
| iv. Secuenciación del ADN de cepas que inhibieron el crecimiento de patógenos | 17 |
| IV. Resultados | 18 |
| i. Aislamiento e identificación de actinobacterias obtenidos | 18 |
| ii. Inhibición del crecimiento de microorganismo patógenos..... | 24 |
| iii. Aislamiento e identificación de otros microorganismos de los adultos de las avispas | 34 |
| iv. Secuenciación del ADN de cepas que inhibieron el crecimiento de patógenos | 36 |
| V. Discusión y conclusiones | 37 |
| Actinobacterias asociadas a los adultos de avispas | 37 |
| Actividad antimicrobiana contra patógenos humanos | 43 |
| VI. Recomendaciones | 44 |
| VII. Agradecimientos | 44 |
| VIII. Referencias | 45 |
| IX. ANEXO: Artículo aceptado para publicación | 53 |

Informe final del proyecto **códigos 1510090 y 1510143**

Evaluación de Microorganismos con Actividad Antimicrobiana Asociados a adultos de Avispas Sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini).

Autores:

Coordinadora: PhD. Laura Chavarría Pizarro. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. laura.chavarria@itcr.ac.cr

PhD. William Rivera Méndez. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. wirivera@itcr.ac.cr

MSc. William Watson Guido. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. wwatson@itcr.ac.cr

RESUMEN

En la actualidad, existe una necesidad urgente de buscar nuevos medicamentos debido a la aparición de patógenos resistentes y de enfermedades infecciosas nuevas. Por este motivo se han realizado estudios sobre los mecanismos de defensa utilizados en la naturaleza, como es el caso de los insectos sociales. Algunos insectos han sido poco estudiados como las avispas sociales. El objetivo de este proyecto fue aislar e identificar actinobacterias asociadas a adultos de avispas sociales y evaluar su acción antibiótica. Para aislar las actinobacterias se colectaron adultos de diferentes especies de avispas. Los microorganismos fueron identificados morfológicamente y por secuenciación del gen 16S. Para determinar la actividad antibiótica de las cepas se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento antimicrobiano utilizando microorganismos que causan infecciones en insectos: *B. thuringensis*, y en humanos: *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Los resultados muestran que las avispas establecen relaciones con actinobacterias de las familias Pseudonocardiaceae, Brevibacteriaceae, Tsukumurellaceae, Microbacteriaceae, Streptomycetaceae, Micrococcaceae y Nocardiosaceae. Además, un 67% de las cepas obtenidas inhibieron el crecimiento de los patógenos, principalmente de *B. thuringensis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Es posible que las avispas utilicen actinobacterias para defenderse del ataque de patógenos debido a que inhibieron el crecimiento de microorganismos patógenos presentada.

Palabras clave: nidos, avispas sociales, adultos, actinobacterias, antibióticos.

I. INTRODUCCIÓN

La comunidad científica ha expresado por medio de comunicados, informes y artículos científicos, su preocupación en relación con la crisis sanitaria que la población humana está enfrentando debido a la resistencia generada por ciertos patógenos (bacterias, virus, hongos, parásitos), a las sustancias antimicrobianas que comúnmente habían sido utilizadas para tratar infecciones, en particular a los antibióticos. La resistencia de los microorganismos patógenos además de ser un problema de salud pública y ocasionar mayor cantidad de decesos, genera pérdidas económicas para los países al incrementar los costos de atención a los pacientes, debido a la mayor duración de la enfermedad y su tratamiento. Estas complicaciones ponen en riesgo la atención que se brinda en los centros médicos.

Por este motivo, la innovación en investigaciones sobre sustancias antimicrobianas, y sobre los organismos que sintetizan estas sustancias, es de gran importancia para el mantenimiento de la salud pública. La comunidad científica de diferentes partes del mundo se ha dado a la tarea de estudiar los mecanismos de defensa que utilizan algunos organismos en la naturaleza como plantas, mamíferos, microorganismos e invertebrados para evitar infecciones. Se ha observado que algunos organismos desarrollan relaciones simbióticas con microorganismos productores de sustancias antimicrobianas para protegerse contra los patógenos.

Dentro de este panorama las colonias de insectos sociales (hormigas, abejas, avispas y termitas) tienen gran potencial como fuente de nuevos compuestos antibióticos debido a las relaciones simbióticas que mantienen con una gran variedad de especies de microorganismos, y a las características de su vida colonial. Tomando en cuenta la premisa anterior, alrededor del mundo se han desarrollado investigaciones para identificar las sustancias antibióticas producidas por diferentes especies de insectos sociales, incluyendo la liderada por el costarricense Adrián Pinto donde se estudiaron los nidos de la hormiga *Apterostigma* y se logró aislar una nueva sustancia antibiótica (selvamicina) en el año 2016. En este momento el grupo de investigación se encuentra desarrollando un medicamento porque la selvamicina inhibe el crecimiento del hongo *Candida albicans* que causa infecciones en las uñas, piel y boca. En Brasil, otro grupo de investigación ha obtenido nuevos compuestos antibióticos a

partir de nidos de hormigas cortadoras de hojas (Attini), como la attinimicina y cifomicina, que también han mostrado actividad contra *Candida albicans*. Estos estudios latinoamericanos (Van Arnam et al. 2016; Fukuda et al. 2021), son ejemplos del potencial que tienen los insectos sociales para la generación de nuevos tratamientos (Matarrita-Carranza et al. 2017).

A pesar de que se han realizado investigaciones en algunas especies de hormigas sobre la microfauna asociada a los nidos, muy poco se ha investigado hasta el momento sobre los microorganismos asociados a las avispas sociales neotropicales (Epiponini). Las avispas presentan una organización social muy similar a la de las hormigas, por lo tanto, es muy probable que al igual que estos insectos, hayan desarrollado algún tipo de asociación con microorganismos para proteger sus nidos del ataque de organismos infecciosos. Esta premisa fue la que permitió desarrollar un proyecto de investigación VIE en los años 2017 y 2018 con el objetivo de hacer una exploración inicial en las celdas e inmaduros de los nidos de las avispas para determinar la presencia de actinobacterias. Las celdas de cría son los lugares del nido con mayor vulnerabilidad para sufrir infecciones, debido a la acumulación de desechos fecales provenientes de las larvas. Como resultado de este proyecto se lograron aislar 25 cepas de actinobacterias, de las cuales un 75% inhibió el crecimiento de las cepas patógenas de *B. thuringensis*, *E. coli*, *C. albicans* y *S. aureus*. Este resultado mostró que las avispas sí establecen relaciones simbióticas con actinobacterias, y que las mismas inhiben el crecimiento de patógenos.

El proyecto de investigación que se describe en este informe tiene como objetivo dar continuidad al proyecto VIE “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a nidos de avispas sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini)”, al estudiar las actinobacterias asociadas a los adultos de las avispas para entender si estas asociaciones se establecen con los estadios inmaduros y celdas cría, o con los adultos. También se evaluó la acción antibiótica de las cepas aisladas de los adultos de avispas contra patógenos que causan infecciones en humanos y en insectos.

II. MARCO TEÓRICO

La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) emitió un comunicado en el año 2018 donde advierte, que para el año 2050 más personas morirán de infecciones que de cáncer, debido a la resistencia a los compuestos antimicrobianos que muchos organismos infecciosos han desarrollado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también ha advertido sobre esta situación, en 2014 presentó un primer informe revelando la grave amenaza que representa para la humanidad la resistencia de los microorganismos infecciosos a los antibióticos. La resistencia a los antibióticos (AMR) sucede cuando las bacterias no responden a la acción de un determinado agente antibiótico al que anteriormente eran sensibles. Este fenómeno sucede a través de mutaciones genéticas, mediante la transferencia horizontal y la expresión de genes de resistencia de otras cepas (Bos & Austin, 2018; de Alcântara et al., 2020; Huddleston, 2014; Pérez et al., 2020).

Esta situación es preocupante ya que infecciones comunes y lesiones menores que han sido tratadas durante años, podrían volver a ser mortales (World Health Organization, 2014). Por ejemplo, en el año 2013 hubo 480.000 casos de tuberculosis multiresistentes en el mundo, además muchas bacterias responsables de infecciones tratables (urinarias, neumonías e infecciones sanguíneas) actualmente son capaces de resistir la acción de los antibióticos. Este es el caso de la gonorrea cuyo tratamiento ya no es eficaz en por lo menos 10 países (World Health Organization, 2014). Solo en Estados Unidos, alrededor de 2 millones de personas se infectan con bacterias como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), causando aproximadamente 23.000 muertes de personas al año (Christaki, Marcou & Tofarides, 2019). Ante esta situación, la OMS ha señalado la importancia de buscar nuevos antibióticos, principalmente en fuentes que no han sido exploradas hasta el momento.

Importancia de los Insectos Sociales como Fuente de Nuevos Antibióticos

Hay muchos organismos en la naturaleza que podrían ser utilizados para buscar nuevos compuestos antibióticos. Hasta el momento se han realizado estudios en diferentes grupos como plantas, mamíferos, microorganismos e invertebrados y se ha determinado que algunos producen sus propias sustancias al desarrollar relaciones simbióticas con

microorganismos productores de compuestos antibióticos; un ejemplo de estos organismos es el grupo de los insectos sociales (Currie et al., 1999; Santos et al., 2004; Kaltenpoth et al., 2005 y 2006; Poulsen et al., 2006; Stow & Bettie, 2008; Kroiss et al., 2010; Graystock & Hughes 2011; Madden et al., 2013; Tranter et al., 2014; Matarrita-Carranza et al. 2017; Fukuda et al. 2021). El potencial de las sustancias antibióticas producidas en las colonias de insectos sociales es grande, ya que los patógenos que atacan sus nidos no han desarrollado resistencia a los antibióticos que ellos producen durante miles de años (Stow & Beattie, 2008); caso contrario a los patógenos que atacan a los humanos que han desarrollado resistencia a las sustancias producidas por la industria farmacéutica.

Los insectos sociales son organismos muy resistentes, han vivido en el planeta desde hace miles de años, y durante todo este tiempo, han logrado sobrevivir en sociedades donde muchos individuos comparten un espacio común (nido) bajo condiciones que podrían facilitar la propagación de parásitos, como: la acumulación de desechos, el mantenimiento de una temperatura confortable y la retención de humedad (Jeanne, 1991). Además, los individuos están altamente relacionados lo que significa una menor variabilidad genética, y mayor probabilidad de transmisión de enfermedades (Hamilton, 1964). A pesar de vivir bajo estas condiciones, los insectos sociales son de los organismos más exitosos del planeta; las hormigas, por ejemplo, son los animales más abundantes en términos de biomasa; y al igual que las avispas, las abejas y las termitas, han logrado colonizar una gran cantidad de hábitats.

Este éxito se debe en gran parte a las respuestas defensivas que han desarrollado para mantener las colonias libres de parásitos como estrategias para mantener los nidos limpios, comportamientos para controlar y eliminar los parásitos, así como el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos que producen sustancias antimicrobianas (Currie et al., 1999; Santos et al., 2004; Kaltenpoth et al., 2005 y 2006; Poulsen et al., 2006; Stow & Bettie, 2008; Kroiss et al., 2010; Graystock & Hughes 2011; Madden et al., 2013; Tranter et al., 2014; Matarrita-Carranza et al. 2017; Fukuda et al. 2021). Por ejemplo, las hormigas cortadoras de hojas (*Atta*, *Acromyrmex*) mantienen una relación simbiótica con actinobacterias del género *Pseudocardia* que secretan sustancias antibióticas para prevenir la infección de hongos como los del género *Escavopsis* en los jardines fúngicos que las hormigas cultivan (Currie et al., 1999; Stow and Bettie, 2008).

También se han obtenido actinobacterias de otros grupos de insectos diferente de las hormigas como: abejas (Mohr et al., 2005, Promnuan et al., 2009, Anderson et al., 2013, Corby-Harris et al., 2014), termitas (Hamilton *et al.* 2011, Rosengaus *et al.* 1998), y avispas (Madden et al. 2013; Matarrita-Carranza et al. 2017; Fukuda et al. 2021); aunque la cantidad de estudios en estos grupos ha sido limitada. Dentro del grupo de las avispas (Vespidae) algunas especies producen sustancias antibióticas en las glándulas mandíbulares y de veneno (Cěřovský et al., 2008; Turillazzi et al., 2004), pero también establecen relaciones simbióticas con microorganismos para proteger sus larvas (Kaltenpoth et al., 2005 y 2006; Kroiss et al., 2010). De manera similar, las termitas secretan sustancias antimicrobianas que producen en glándulas esternales y de la cabeza; y también se ha encontrado una gran diversidad microbiana asociada a la cutícula de los adultos y a la materia fecal (Hamilton et al. 2011, Rosengaus et al. 1998).

Por otro lado, los microorganismos asociados a las avispas sociales neotropicales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini), han sido poco estudiados hasta el momento, las investigaciones realizadas hasta ahora se han enfocado en la acción antimicrobiana de los péptidos del veneno (Cěřovský et al., 2008; Rocha et al., 2007; Zhang et al. 2010; Mortari et al., 2012) y las glándulas salivares (Turillazzi et al., 2004). Sin embargo, las avispas sociales son ideales para realizar estudios exploratorios sobre la presencia de actinobacterias ya que en las celdas de cría de los nidos se acumulan desechos fecales (meconia) producidos por las larvas, lo que quiere decir que, al haber reutilización de celdas, los inmaduros (huevo, larvas y pupas) se desarrollan por encima de estos desechos (Jeanne, 1991). Al ser el meconia un sustrato ideal para el desarrollo de parásitos, debería secretarse o producirse algún tipo de sustancia antimicrobiana dentro del nido para evitar infecciones en los inmaduros y adultos.

A pesar de su potencial, hasta el momento no se conoce bien dónde son producidas las sustancias antimicrobianas en las colonias de avispas sociales, ya que podrían producirse desde varias fuentes: los microorganismos podrían estar asociados a la cutícula de las larvas o adultos, a las heces de las larvas, o incluso a la estructura del nido. También podrían ser producidos en las glándulas salivales o el intestino de los adultos. En el proyecto de investigación VIE “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a nidos de avispas sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini)”, se aislaron

microorganismos de las celdas de cría, demostrando que hay actinobacterias asociadas a la estructura de los nidos de las avispas.

Sin embargo, es importante determinar si los microorganismos encontrados en los nidos podrían estar asociados a los adultos; ya que existe la posibilidad de que las sustancias antibióticas sean producidas por microorganismos asociados a las glándulas salivales o el intestino de las hembras. Cuando un inmaduro completa su desarrollo y abandona la celda de cría, las obreras y reinas son observadas introduciendo su cabeza dentro de la celda (Jeanne, 1991). Estas observaciones indican que posiblemente los adultos inspeccionan rigurosamente las celdas para limpiar o esterilizar el interior de la cámara, para impedir el desarrollo de infecciones en la colonia. Las asociaciones entre adultos y microorganismos han sido observadas en otros grupos de insectos; por ejemplo, algunas hormigas secretan sustancias antibióticas desde glándulas que están localizadas en las extremidades o en las mandíbulas (Brough, 1983, Veal et al., 1992) y en las glándulas salivales (Clardy, Fischbach & Currie, 2009), una especie de avispa solitaria tiene actinomicetos asociados a las antenas (Kaltenpoth et al., 2005 y 2006; Kroiss et al., 2010); y como se mencionó anteriormente en termitas y hormigas los microorganismos están asociados a la cutícula o glándulas salivares.

Las avispas sociales también podrían albergar microorganismos en las glándulas salivales y torácicas, ya que, al utilizar sus partes bucales para desarrollar varias actividades (alimentación, trofalaxis, limpieza, para excavar en el suelo, matar presas, etc), es probable que desarrollaran algún mecanismo evitar infecciones. Según Landolt & Akre (1979) las avispas sociales tienen alrededor de ocho pares de glándulas en la cabeza asociadas con las partes bucales que permiten brindar señales químicas para la defensa contra microorganismos u otros insectos, el apareamiento, la construcción y guía hacia los nidos, regulación de la puesta de huevos, y la comunicación (Penagos, Billen & Sarmiento, 2015).

Entre estas glándulas, la salival es la más grande debido que se compone de dos secciones: (a) un par de lóbulos protorácicos y (b) una sección mesotorácica, la cual se conecta con una bolsa conocida como salivarium. El tejido de la glándula está compuesto por células conocidas como acinos, los cuales tienen un diámetro de 0.05 a 0.07 mm (Landolt & Akre, 1979). Las glándulas mandibulares, son glándulas de tipo cefálicas que se encuentran en la región lateral de la cabeza. Además, se ha reportado que las avispas sociales tienen

compuestos antibióticos en saliva y en las glándulas del veneno (Stow et al., 2007), por lo que es muy probable que alberguen microorganismos productores de sustancias antibióticas en estas estructuras.

Muchas de las interacciones simbióticas entre avispas con microorganismos involucran las actinobacterias, un filo que produce una diversidad de metabolitos secundarios antimicrobianos y que se ha reportado en la cutícula de avispas sociales y en nidos de *Polistes dominulus* (Kaltenpoth et al., 2005 y Kaltenpoth et al. 2006; Kroiss et al., 2010; Hamilton et al., 2011, Rosengaus et al. 1998).

Actinobacterias

Las actinobacterias son un grupo de gran interés debido a que muchas especies producen sustancias antibióticas (Goodfellow & Williams, 1983; Kaltenpoth, 2009; Seipke et al., 2011; Bérdy, 2012), son bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina y citosina en su ADN que producen un micelio no septado y fino. Las colonias de actinobacterias muestran una consistencia pulverulenta y se adhieren firmemente a la superficie de agar, produciendo hifas, conidios y/o esporangios similares a la de los hongos en medios de cultivo. Dicho filo representa una de las unidades taxonómicas más grandes dentro del dominio bacteria y son de naturaleza diversa, donde la mayoría de sus especies son de vida libre, encontrándose tanto en hábitats terrestres como en acuáticos, además, representan alrededor del 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos que hasta ahora han sido descubiertos (Lawson, 2018; Park et al., 2014; Verma et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Los miembros del taxón son también de interés por su importancia en la agricultura y la ecología, donde están involucrados en el intercambio de la materia orgánica y compuestos xenobióticos; se han reportado asociaciones de actinos como fijadores de nitrógeno con plantas no leguminosas. Y como se mencionó anteriormente también son de interés al ser una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, aproximadamente 10,000 metabolitos bioactivos son producidos por las actinobacterias, lo que representa el 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos descubiertos (Anandan *et al.*, 2016). Algunos ejemplos de estos metabolitos son: la kanamicina,

gentamicina, neomicina, estreptomina, cloranfenicol, novobiocina, vancomicina, teicoplanina, eritromicina, rifamicina, clortetraciclina, oxitetracy entre otros (Shah et al., 2017; Stach et al., 2003; Ul-Hassan & Wellington, 2009).

La morfología ha sido una característica importante para identificar los aislamientos de actinobacterias, se han utilizado diversas observaciones morfológicas para identificar que incluyen la germinación de esporas, la elongación y la ramificación del micelio vegetativo, la formación de micelio aéreo, el color del micelio aéreo y del sustrato y la producción de pigmentos. Además de la identificación morfológica, también se puede realizar una clasificación basada en el genotipo por medio de la región del gen 16S ARNr. Este es un gen que se encuentra incluido en la subunidad pequeña 30S del ribosoma bacteriano y mide aproximadamente 1.500 nucleótidos, tamaño que proporciona suficientes polimorfismos interespecíficos para diferenciar y establecer relaciones filogenéticas y por ende, su correcta clasificación e identificación, mostrando una posición evolutiva cuando se hace una comparación entre los miembros en estudio (Bou, et al., 2011; Ludwig et al., 2012).

El gen 16S rRNA está presente en todas las bacterias, es funcionalmente constante y está compuesto de regiones altamente conservadas y regiones más variables. Algunos otros métodos moleculares se han utilizado en la clasificación de procariotas, como la tipificación de secuenciación multilocus (MLST), y el análisis SDS-PAGE de proteínas solubles de células completas, la estructura secundaria (Sullivan *et al.* 2005). Sin embargo, la era de la genómica indica que algunas características genómicas tienen un gran potencial en la taxonomía de las bacterias y las arqueas, como sustituto del método tradicional de determinación del contenido G + C y la técnica de hibridación de ADN-ADN, técnicas que al final resultan ser muy laboriosas (Ramasamy *et al.* 2014).

Aspectos generales sobre la clasificación de las avispas de la tribu Epiponi

Las avispas utilizadas en este estudio pertenecen a la subfamilia Polistinae dentro de la familia Vespidae, que a su vez está formada por dos tribus donde los individuos presentan comportamiento sub social (Polistini y Mischocttarini), y una donde se caracterizan por tener una estructura eusocial (Epiponini). Dentro de Epiponini se distinguen cuatro clados:

- 1- Uno más basal que comprende los géneros *Agelaia* y *Apoica*: estas avispas se caracterizan por compartir algunas características con las avispas sub sociales de las tribus Polistini y Mischocyttarini, como construcción de nido sin cubierta (Wenzel, 1998), y diferencias de forma entre las castas (reinas y obreras) (Noll, 2005).
- 2- Otro que incluye a los géneros *Parachartergus*, *Chartergellus*, *Nectarinella*, *Leipomeles* y *Pseudopolybia*: entre otras características estas avispas construyen nidos tipo estelocítaro caliptódomo con panales peciolados y la entrada hacia abajo (Wenzel, 1998); no hay diferencias morfológicas entre las castas (Noll, 2005).
- 3- El tercero que incluye a *Metapolybia*, *Synoeca*, *Asteloeca* y *Clypearia*: que se caracterizan por construir nidos tipo astelocítaros con el panal adherido a la superficie y la entrada ubicada hacia arriba (Wenzel, 1998); sin diferencias morfológicas entre las castas pero sí fisiológicas (Noll, 2005).
- 4- El grupo más derivado comprende a *Protopolybia*, *Polybia*, *Brachygastra*, *Epipona*, *Charterginus*, *Chartergus* y *Protonectarina*: con nidos tipo stelocítaro caliptódomo o fragmocítaros, y diferenciación de casta variable en algunas especies de forma o tamaño (Noll, 2005).

Las colonias de avispas Epiponini ofrecen muchas posibilidades para la búsqueda de compuestos antibióticos, debido a la gran variabilidad que existe entre las especies para adaptarse a diferentes condiciones, por este motivo se seleccionó este grupo para desarrollar el presente proyecto de investigación. Es posible que existan diferentes tipos de asociaciones con microorganismos dentro del grupo, las colonias de avispas ofrecen una gran variedad de fuentes para la búsqueda de antimicrobianos al utilizar diferentes materiales (barro, fibras, secreciones bucales) y sustratos (hojas, troncos, construcciones) para la construcción de sus nidos (Wenzel, 1998). También por estar distribuidas en diferentes hábitats (ciudades, agroecosistemas, bosques húmedos y secos) y pisos altitudinales (desde el nivel del mar hasta el Cerro de la Muerte); y finalmente porque presentan diferentes estrategias sociales y tamaños de población (desde una decena hasta millones de individuos) (West-Eberhard, 1982; Jeanne, 1991, Chavarría & West-Eberhard, 2010).

III. METODOLOGÍA

i. Aislamiento de actinobacterias de los nidos de avispas sociales

Como primer paso se obtuvieron los permisos del CONAGEBIO para realizar la colecta de los nidos de avispas. Se solicitó permiso para realizar colecta en los siguientes sitios: Instituto Tecnológico de Costa Rica campus tecnológico de Cartago, en el Refugio Nacional de Fauna Silvestre Golfito, en la Organización para Estudios Tropicales en Sarapiquí (resolución R-CM-ITCR-001-2019-OT); y en la finca propiedad de Agropecuaria Santa Bárbara (resolución R-CM-ITCR-002-2019-OT).

a. Recolección de nidos de avispas

Se colectaron muestras de adultos de diferentes especies de avispas neotropicales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae) pertenecientes a la tribu Epiponini (Fig. 1). Este grupo de avispas está formado por 19 géneros que se encuentran exclusivamente en el Neotrópico, localizados desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. Dentro de la filogenia de Epiponini se pueden distinguir cuatro clados principales (Fig. 2); para obtener muestras representativas del grupo se colectaron muestras de adultos de una especie representante de un género de tres clados como se describe a continuación: clado 2 *Parachartergus* y *Chartergellus*; clado 3 *Metapolybia*; clado 4 *Polybia* y *Protopolybia* (Fig. 2). Se colectaron adultos de la especie *Apoica* del clado 1, sin embargo, estos ejemplares no pudieron ser utilizados debido al cierre de la Institución en marzo de 2020 por la pandemia de CoVid-19.

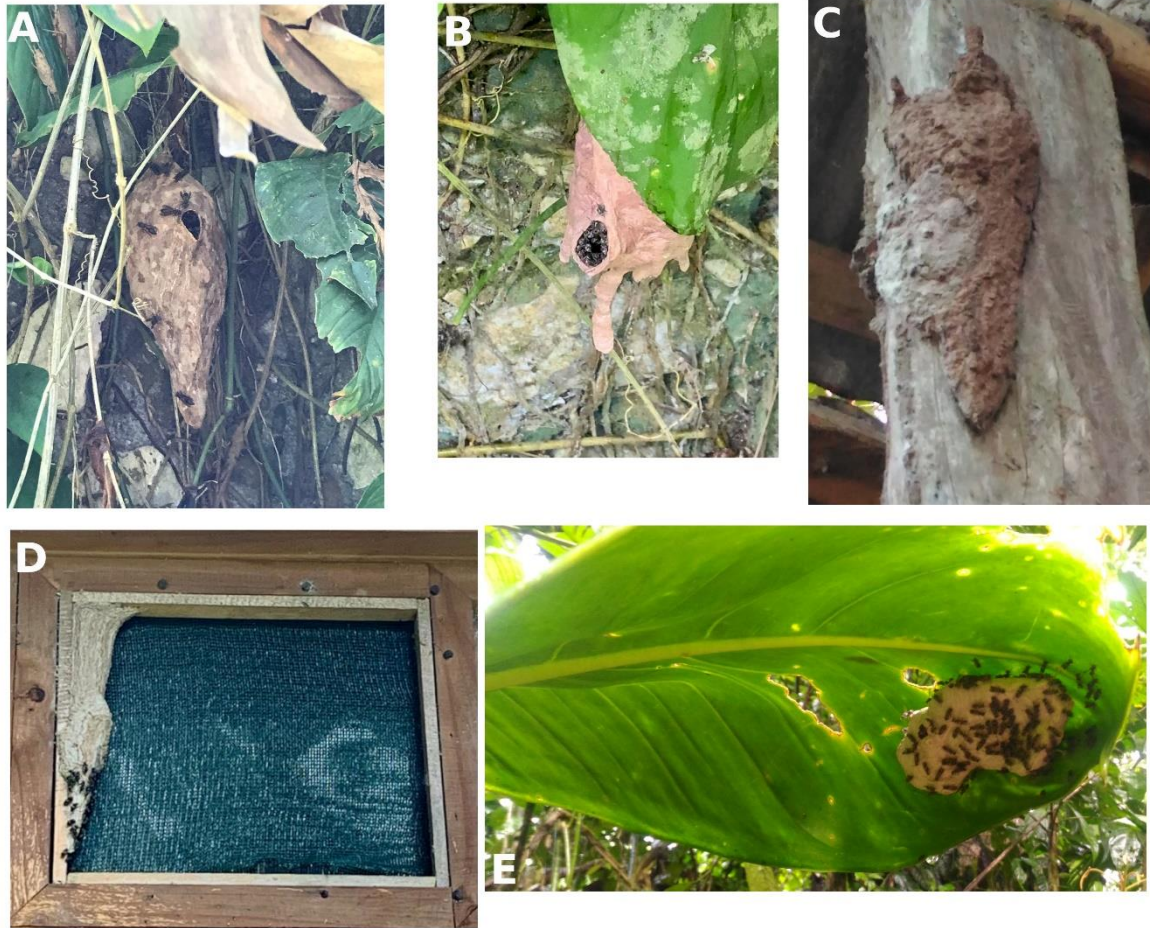


Figura 1. Nidos de *Polybia* sp. (A y B), *Metapolybia* sp. (C), *Chartergellus golfitensis* (D), y *Protopolybia* sp. (E) respectivamente, utilizados para tomar muestras.

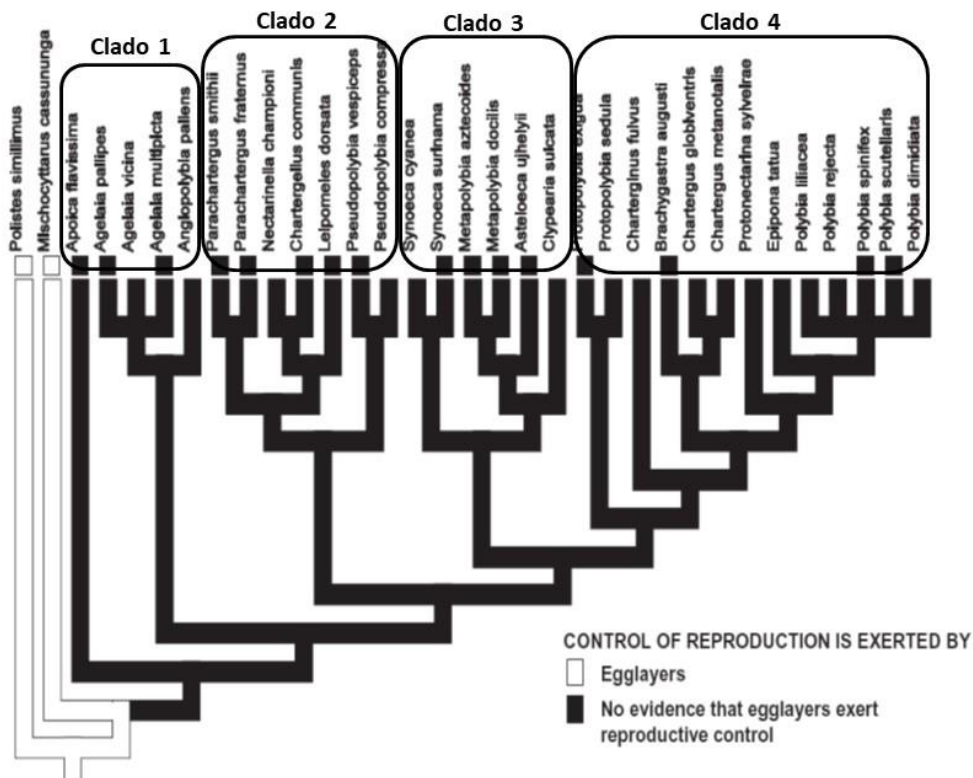


Figura 2. Hipótesis filogenética sobre la evolución de castas relacionada con el control reproductivo (Noll & Wenzel 2008) optimizada del árbol propuesto por Wenzel & Carpenter (1994). Los principales clados del grupo están incluidos en los cuadros.

Como se mencionó anteriormente, se colectaron muestras de adultos en cuatro regiones de muestreo: Pacífico Norte (Santa Cruz, Guanacaste), Valle Central (Cartago), Atlántico (La Selva en Sarapiquí), Pacífico Sur (Golfito, Puntarenas). Los detalles sobre la cantidad de nidos y géneros colectados en cada sitio de muestreo se resumen en el cuadro 1. Se colectó una muestra de 15 adultos (obreras) de las especies utilizadas para no causar impacto sobre toda la población. Las muestras se tomaron con bolsas Ziploc estériles, para almacenar a 4°C en una hielera, y posteriormente en la refrigeradora del Laboratorio de Bacteriología del Centro en Investigación en Biotecnología.

Cuadro 1. Cantidad de muestras colectadas en los sitios de colecta para los nidos de las diferentes especies utilizadas.

| Nombre | Código Nido | Sitio Colecta | Fecha Colecta |
|--------------------------------------|--------------------|--|----------------------|
| <i>Polybia sp1</i> | PbSB-01 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 20/04/2019 |
| <i>Metapolybia sp1</i> | MSB-01 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 08/06/2019 |
| <i>Parachartergus sp1</i> | MPchC-01 | Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago (ITCR) | 19/07/2019 |
| <i>Protopolybia sp1</i> | PrtSel-01 | La Selva, Sarapiquí (OET) | 20/07/2019 |
| <i>Polybia sp2</i> | PbC-01 | ITCR | 31/07/2019 |
| <i>Polybia sp1</i> | PbStC-02 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 06/09/2019 |
| <i>Parachartergus sp2</i> | MPchSB-02 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 02/08/2019 |
| <i>Polybia sp3</i> | PbSB-02 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 28/09/2019 |
| <i>Metapolybia sp1</i> | MSB-02 | Santa Bárbara, Santa Cruz | 28/09/2019 |
| <i>Polybia sp4</i> | PbG-01 | Refugio Nacional de Vida Silvestre Golfito (RFSG) | 30/01/2020 |
| <i>Polybia sp5</i> | PbG-01 | RFSG | 30/01/2020 |
| <i>Protopolybia sp2</i> | PrtG-01 | RFSG | 30/01/2020 |
| <i>Apoica sp1</i> | ApG-01 | RFSG | 30/01/2020 |
| <i>Polybia sp6</i> | PbG-03 | RFSG | 19/03/2021 |
| <i>Polybia sp7</i> | PbG-04 | RFSG | 19/03/2021 |
| <i>Chartergellus golfitensis</i> | ChG-01 | RFSG | 19/03/2021 |

b. Aislamiento de microorganismos productores de antibióticos de los adultos

Para aislar los microorganismos se inocularon las obreras de las colonias de avispas de las especies mencionadas en el apartado anterior, en medios de cultivo. Para obtener los microorganismos de los adultos se utilizó la metodología propuesta por Madden et al. (2013) y Hamilton et al. (2011). Los aislamientos de actinobacterias para el género *Parachartergus* de Cartago y Santa Cruz fueron realizados como parte de dos trabajos finales de graduación de los estudiantes Mariela Gutiérrez Araya y Pablo Jiménez Carrillo. En el trabajo de la

estudiante Gutiérrez Araya se aislaron microorganismos de las glándulas salivales, y en el trabajo de Jiménez Carrillo se aislaron de diferentes partes de la cutícula.

Para realizar los rayados se utilizaron los siguientes medios de cultivo: a) Luria-Bertani al 1% (15% bacto agar); b) Medio de Aislamiento para Actinobacterias (BD); c) medio ISP1; d) medio ISP2. Para disminuir el crecimiento de microorganismos diferentes de los actinobacterias se agregó a los medios de cultivo nistanina (0,1%) y ácido nalidixico (10ug/ml). Para obtener los microorganismos de la cutícula de los adultos, una obrera fue inoculada por medio de cultivo. Cada obrera fue colocada directamente en el medio con pinzas estériles y se fue rozando la superficie a través de toda la placa, de forma que todas las partes del insecto tocaran toda la placa. Para obtener los microorganismos de las glándulas, se procedió a disecar en un estereoscopio con pinzas entomológicas estériles, la cabeza y tórax de las obreras para obtener las glándulas salivales. Las glándulas obtenidas fueron homogenizadas en vortex con 30 ul de 100 mM de acetato de sodio (pH 5) por 15 segundos. Luego se colocó 20 ul de la solución homogenizada en el medio de cultivo para hacer el rayado. También se utilizó una avispa por medio de cultivo. Una vez realizados los rayados las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (~22°C) por aproximadamente un mes. Las colonias que presentaron morfología que indicaba la presencia de actinobacterias, fueron seleccionadas para purificación adicional y preservación.

ii. Identificación molecular de los microorganismos productores de antibióticos

El ADN genómico se extrajo utilizando dos protocolos: a) el primer método fue basado en CTAB de acuerdo a las modificaciones de Pérez et al. (2017); b) y el segundo utilizando el protocolo propuesto por Chun y Goodfellow (1995). La extracción debía ser realizada en dos días. Durante el primer día se tomó 1 mg de esporas y micelio de la cepa de actinobacteria y se colocó en un microvial de 1,5 mL, luego se lavó el material con agua destilada estéril (1 mL) y se centrifuga a 14000 rpm (máxima velocidad) por 7 min. Posteriormente se repitió el procedimiento anterior, pero ahora con solución STE (100 mM NaCl + 25 mM Tris + 10 mM de EDTA). El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 400µL de STE, se agregó 20 µL de una solución de lisozima (50 mg/mL) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Durante el segundo día luego de la incubación, se agregaron 100 uL de SDS al 20%, se agitó en vortex por un minuto y se incubó a 55°C en baño maría por una hora. A continuación, se adicionaron 100 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm (máxima velocidad) por 5 min. La fase acuosa superior se transfirió a otro vial de 1,5 mL y se añadió un volumen igual (aproximadamente 650 µL) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm (máxima velocidad). La fase superior se transfirió a un nuevo vial de 1,5 mL, se agregó un volumen igual de isopropanol (aproximadamente 500 µL) previamente enfriado a -20°C. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm (máxima velocidad) por 7 min, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol 70% (1 mL) previamente enfriado a -20°C. El botón de ADN se resuspendió en 50-100 uL de buffer TE autoclavado (10mM Tris-HCl + 1 mM EDTA) con 1 µL de ARNasa (10 mg/ml) y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Las muestras de ADN fueron enviadas a Psomagen para amplificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante los softwares BioEdit (Hall, 1999) y Snapgene Viewer®, para luego comparar contra la base de datos de secuencias públicas GenBank, utilizando BLAST.

iii. Determinación de la actividad antibacteriana de las cepas obtenidas de los nidos de avispas

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las actinobacterias aisladas se utilizó el método de difusión en disco. La actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano y fúngico, se evaluó sobre las cepas *Escherichia coli* ATCC 25992, el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, y la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; se seleccionaron estos microorganismos ya que producen infecciones comunes en seres humanos. También se evaluaron las cepas de actinobacterias sobre el patógeno de insectos *Bacillus thuringensis*. Para dicho método, se prepararon placas de agar nutritivo vertiendo 20 mL de en placas Petri de 100 mm de diámetro. Cuando el medio se solidificó se sembró por extensión sobre la placa 0,2 mL de un cultivo de 24 horas, de las bacterias a evaluar. Finalmente, se colocaron sobre la placa un fragmento de medio, de 1 cm de diámetro,

de una placa donde el actinomiceto se dejó crecer. Las zonas de inhibición fueron medidas después de 24 horas de incubación a 37°C. Como control positivo para las bacterias se utilizó Kanamicina (KM) 6mg/ml para los ensayos con *P. aeruginosa*, *B. thuringensis* y *S. aureus*; y 5 mg/mL con *E. coli*. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Los ensayos se hicieron por triplicado, y la inhibición del crecimiento del patógeno se determinó en relación con el control positivo, sí se formaba un anillo de inhibición evidente se consideraba positiva, y negativa si el anillo de inhibición no era evidente. Los resultados obtenidos de las réplicas fueron promediados.

iv. Secuenciación del ADN de cepas que inhibieron el crecimiento de patógenos

Adicionalmente, gracias a la colaboración del Dr. Javier Pizarro Cerda del Instituto Pasteur de París, se secuenció el genoma de cinco de las cepas que inhibieron el crecimiento de tres patógenos (*B. thuringensis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*): 6M, 6T, 6V, 7B y 8L; y una cepa que inhibió el crecimiento de todos los patógenos: 7G. El objetivo de secuenciar el genoma era identificar la presencia de metabolitos secundarios productores de sustancias antimicrobianas. Este análisis fue realizado en la tesis de licenciatura de la estudiante Mariela Gutiérrez Araya. El genoma de las cepas se secuenció con la plataforma de análisis “Mutualized Platform for Microbiology (P2M)” del Instituto Pasteur (París, Francia); y se realizó una anotación funcional y estructural del genoma con herramientas bioinformáticas, donde se identificaron grupos de genes biosintéticos putativos. Además, la estudiante realizó un análisis taxonómico de las cepas, para determinar la identidad de los nucleótidos basados en el genoma completo (ANI). El estudio realizado por la estudiante permitió realizar un análisis preliminar del potencial que tienen los metabolitos producidos por las cepas aisladas de avispas, en el descubrimiento de moléculas de importancia clínica particularmente antibióticos, que será retomado en futuros proyectos de investigación.

IV. RESULTADOS

i. Aislamiento e identificación de actinobacterias obtenidos

De las muestras de los adultos de las 16 colonias muestreadas se obtuvieron en total 63 morfotipos de cepas que tenían similitud con actinobacterias. La región de donde se obtuvieron mayor cantidad cepas fue de Santa Cruz (N=37), de Golfito se obtuvieron 6, de la Selva 2 y de Cartago 1 cepa (fig. 3). La cantidad de colonias muestreadas en cada sitio se especifica en el cuadro 1. De los individuos de donde se obtuvo una mayor cantidad de cepas fue de las colonias del género *Polybia* (N=23), seguido de *Parachartergus* (N=20), y luego *Metapolybia* (N=17). En el caso de *Protopolybia* (N=3) solo se pudo obtener muestras de un nido en La Selva y en Golfito debido a los atrasos en las colectas del proyecto por la pandemia de CoVid-19, lo que pudo afectar la cantidad de cepas encontradas (cuadro 1, fig. 3).

De las 63 cepas identificadas morfológicamente, un 78% (N=49) efectivamente eran actinobacterias cuando fueron comprobadas molecularmente. Las restantes 14 cepas, 12 fueron identificadas molecularmente como proteobacterias, y dos como Firmicutes; además fueron encontradas cepas de otra Proteobacteria, *Methylobacterium*, en todas las muestras, sin embargo su cantidad no fue cuantificada (ver sección “Aislamiento e identificación de otros microorganismos de los adultos de las avispas sociales”). La búsqueda en BLAST reveló que las cepas de actinobacterias obtenidas tenían una alta similitud (entre 95 y 97%) con 8 géneros (cuadro 2), la mayor parte de las cepas pertenecía al género *Saccharopolyspora* (N=24) (fig. 4), *Streptomyces* (N=7) (fig. 5) y *Amycolaptosis* (N=6). Las cepas de *Amycolaptosis*, *Nocardiopsis* (fig. 6) y *Brevibacterium* (fig. 7) fueron obtenidas solo de las obreras de las colonias de Santa Cruz. Las cepas de *Tsukamurella* (fig. 8) fueron obtenidas solo de Golfito. Por otro lado, *Saccharopolyspora* se aisló de las obreras de todas las regiones con excepción de Cartago, *Streptomyces* no se obtuvo de las obreras de Santa Cruz; y *Microbacterium* (fig. 9) y *Kocuria* (fig. 10) no fueron aislados de las obreras de La Selva ni de Golfito, (cuadro 2).

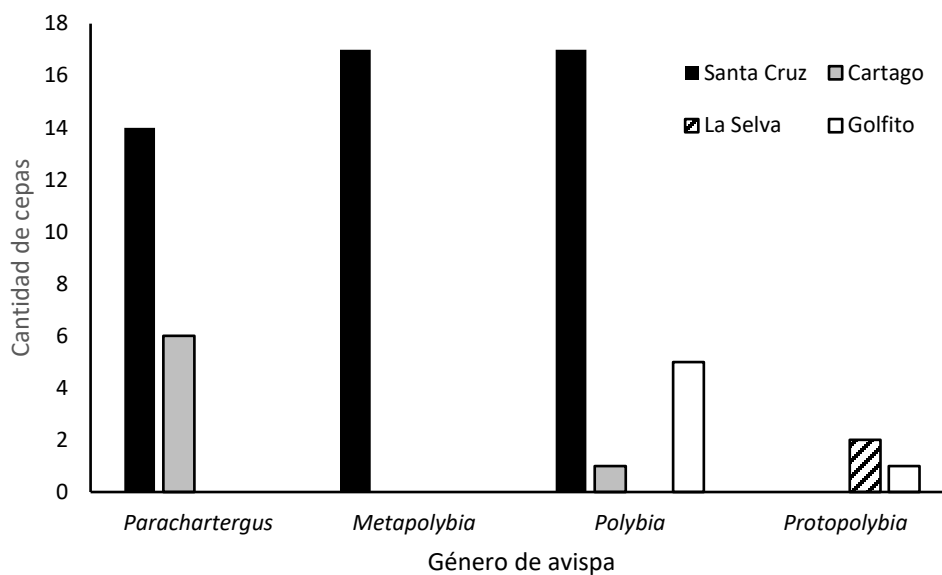


Figura 3. Cantidad de cepas de actinobacterias obtenidas de las celdas de cría de las cuatro regiones estudiadas según los géneros de avispas Epiponini utilizados.

Cuadro 2. Géneros de actinobacterias aislados de las obreras de las colonias de avispas de las cuatro regiones muestreadas.

| Género | Guanacaste | Cartago | La Selva | Golfito | Total |
|--------------------------|------------|---------|----------|---------|-------|
| <i>Saccharopolyspora</i> | 22 | 0 | 1 | 1 | 24 |
| <i>Streptomyces</i> | 0 | 4 | 1 | 2 | 7 |
| <i>Amycolaptosis</i> | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| <i>Microbacterium</i> | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Nocardiopsis</i> | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Kocuria</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Tsukamurella</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| <i>Brevibacterium</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

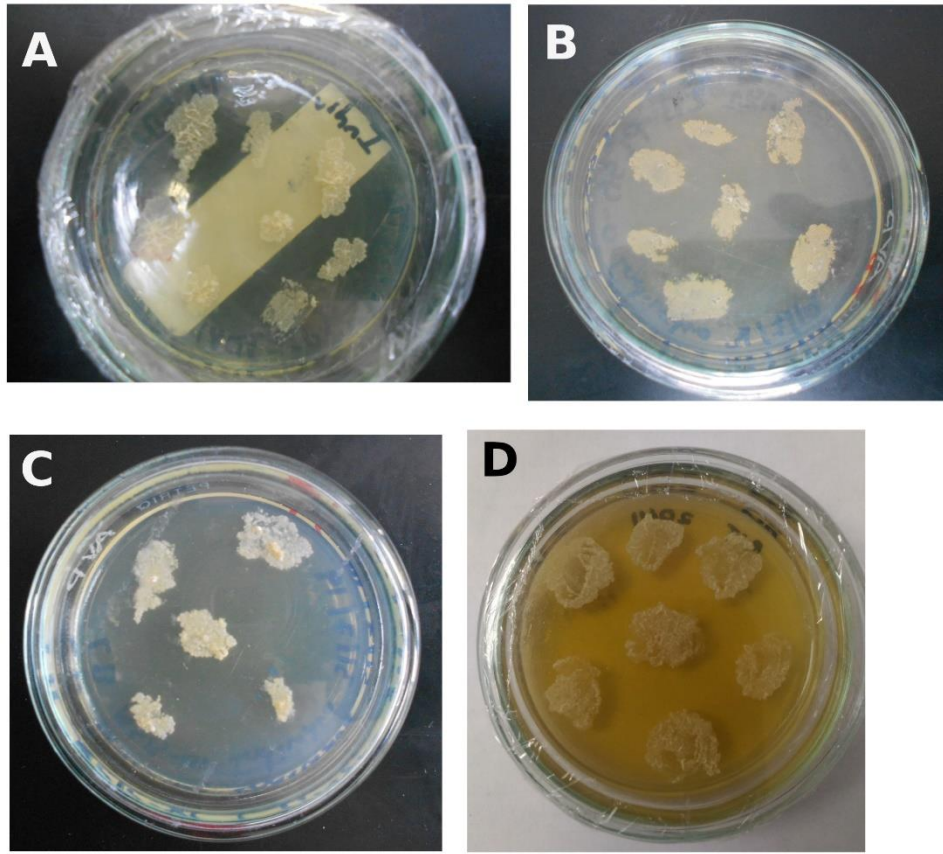


Figura 4. Algunas cepas (A-6A, B-6K, C-6T, D-7Z) de *Saccharopolyspora* sp. aisladas de las obreras de las diferentes especies de avispas.

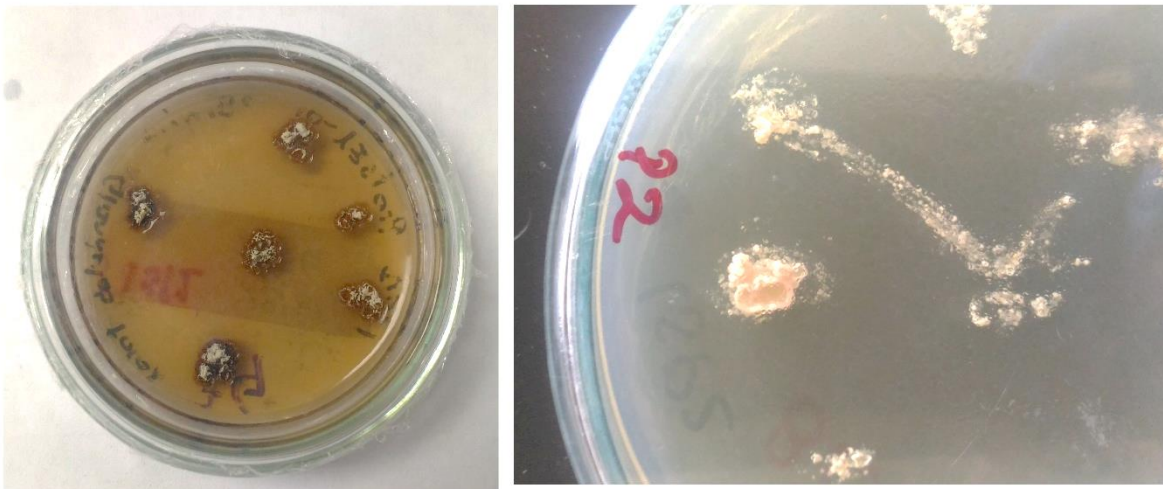


Figura 5. Algunas cepas (7G y 8L respectivamente) de *Streptomyces* aisladas de las obreras de las diferentes especies de avispas.

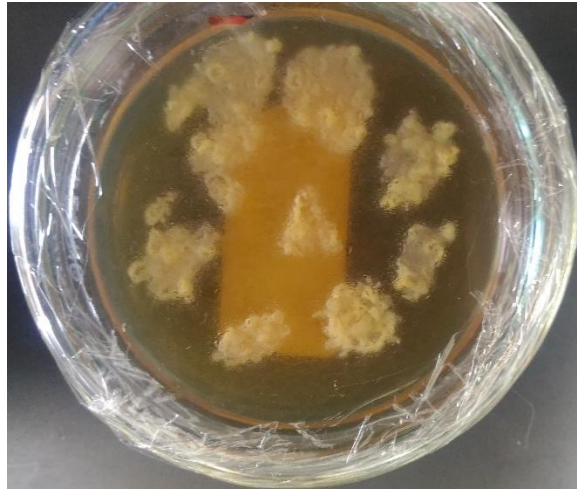


Figura 6. Cepa de *Nocardiopsis* (7B) aisladas de las obreras de *Metapolybia* sp. en Santa Cruz, Guanacaste.



Figura 7. Cepa de *Brevibacterium* (6P) aisladas de las obreras de *Metapolybia* sp. de Santa Cruz, Guanacaste.



Figura 8. Cepa de *Tsukamurella* (8J) aislada de las obreras de *Polybia* sp. en Golfito, Puntarenas.



Figura 9. Cepa de *Microbacterium* (8G) aisladas de las obreras de *Parachartergus* sp. en Santa Cruz, Guanacaste.



Figura 10. Cepa de *Kocuria* (6L) aislada de las obreras de *Polybia* sp. de Santa Cruz Guanacaste.

En relación a la estructura del individuo de la cual fue obtenida la cepa, la mayor fue aislada de la cutícula (N=47), y 16 fueron obtenidas a partir de las glándulas salivales. Las cepas de *Microbacterium* fueron obtenidas únicamente de las glándulas salivales, *Kocuria*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* también fueron obtenidas de las glándulas pero también se encontraron en la cutícula de las obreras. Por otro lado, *Amycolaptosis*, *Brevibacterium*, *Nocardiopsis* y *Tsukamurella* fueron obtenidas solo a partir de la cutícula de las obreras. Sin embargo, de las obreras colectadas de la región de Golfito, no se pudo extraer las glándulas salivales debido al cierre institucional en 2020 por la pandemia, y en el año 2021 debido al poco tiempo de ampliación dado para terminar el proyecto.

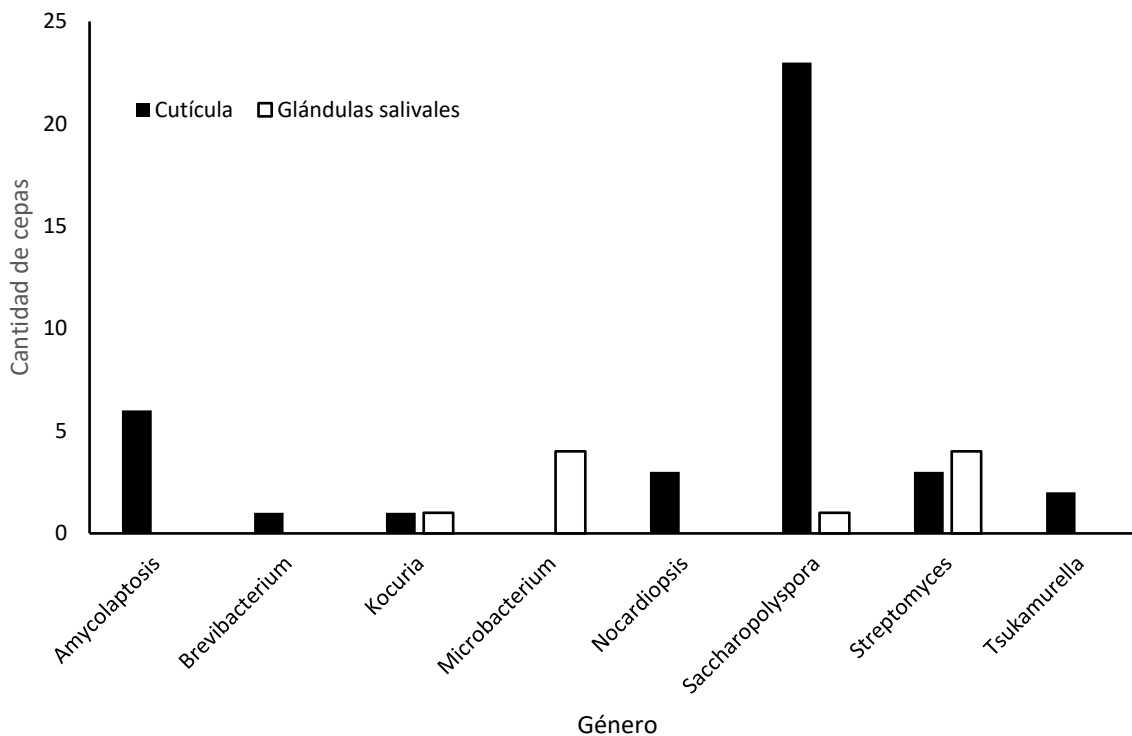


Figura 11. Cantidad de cepas de los diferentes géneros de actinobacterias obtenidas de la cutícula o glándulas salivales de las obreras de las colonias de avispa Epiponini estudiadas.

ii. Inhibición del crecimiento de microorganismo patógenos

De las 49 cepas obtenidas de actinobacterias, 33 inhibieron el crecimiento de microorganismos patógenos, es decir, un 67% del total. En cuatro de las cepas de actinobacterias (8%) no se pudo obtener suficiente biomasa para realizar las pruebas de inhibición, y 12 de las cepas (24,5%) no inhibieron el crecimiento de ningún microorganismo patógeno.

Todas las cepas que inhibieron el crecimiento de patógenos, presentaron actividad contra *B. thuringensis*; las cepas que presentaron un mayor halo de inhibición (2,1 cm) fueron *Saccharopolyspora* (6A), *Microbacterium* (8G) y *Streptomyces* (8L) (cuadro 3). Dos cepas de *Saccharopolyspora* (6N y 6Z) presentaron un halo de inhibición de 2,05 cm (cuadro 3) (fig. 10). La mayor parte de las cepas con actividad antibiótica se obtuvo de Guanacaste

(N=22) (fig. 11), estas cepas fueron aisladas de los adultos de *Metapolybia* (N=10), *Parachartergus* (N=6) y *Polybia* (N=6) (cuadro 3).

De forma similar, la mayor parte de las cepas (88%) inhibieron el crecimiento del patógeno *E. coli* (N=29), las cepas que presentaron mayor halo de inhibición fueron de los géneros *Brevibacterium*-6P (2,05 cm), *Saccharopolyspora*-6M y *Streptomyces*-8L (1,25 cm) (cuadro 3) (fig. 12). La mayor parte de las cepas que inhibieron a *E. coli* se obtuvo de Guanacaste (N=22) (fig. 13), que corresponden con las cepas que también presentaron inhibición contra *B. thuringensis* (cuadro 3).

En el caso del patógeno *P. aeruginosa*, 67% de las cepas (N=22) inhibieron su crecimiento, las cepas que presentaron un mayor halo de inhibición fueron de *Saccharopolyspora*-6W (2,05 cm) y 6M (1,95 cm), y *Brevibacterium*-6P (1,85 cm) (cuadro 3) (fig. 14). La mayor parte de las cepas con inhibición se obtuvieron de Guanacaste (N=13) (fig. 15), mayormente de los adultos de *Metapolybia* (N=7) y *Parachartergus* (N=5).

Por otro lado, en general las cepas obtenidas de los adultos de avispas presentaron menor grado de inhibición contra el crecimiento del patógeno *S. aureus*. Solo un 30% de todas las cepas (N=10) formó un halo de inhibición, que fueron evidentemente menores a los presentados contra los otros patógenos (fig. 16). Por ejemplo, una cepa de *Streptomyces*-7G presentó un halo de inhibición de 0,15 cm, una cepa de *Microbacterium*-8G de 0,1 cm y una cepa de *Saccharopolyspora*-8S de 0,53 cm (cuadro 3) (fig. 16). La mitad de las cepas que inhibieron a *S. aureus* fueron aisladas de adultos de Guanacaste (fig. 17), todas de *Parachartergus*.

Ocho de las cepas aisladas presentaron halo de inhibición contra todos los patógenos: tres eran *Streptomyces* (7G, MA, MP), tres de *Amycolaptosis* (P1P, P1S, P2B), una de *Saccharopolyspora* (8S), y una de *Nocardiosis* (P1A) (cuadro 3). Trece cepas formaron halo de inhibición contra tres patógenos: siete eran del género *Saccharopolyspora* (6I, 6M, 6T, 6U, 6V, 6W, P1U), dos de *Microbacterium* (8G y MO), una de *Nocardiosis* (7B), y una de *Tsukamurella* (8J) (cuadro 3).

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento de cuatro cepas patógenas por parte de las cepas de actinobacterias aisladas de los adultos de los diferentes géneros de avispas sociales.

| Género Avispa | Actinobacteria | Cepa | Halo de inhibición | | | |
|-----------------------|--------------------------|------|------------------------|----------------|------------------|----------------------|
| | | | <i>B. thuringensis</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6A | 2,10 | 1,15 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6B | 0,90 | 0,55 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6G | 1,80 | 0,35 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6I | 1,46 | 1,18 | 0 | 0,78 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6J | 1,30 | 0,55 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6K | 1,50 | 1,05 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6M | 1,65 | 1,25 | 0 | 1,95 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6N | 2,05 | 0,90 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6O | 1,15 | 0,50 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Brevibacterium</i> | 6P | 1,80 | 2,05 | 0 | 1,85 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6T | 0,98 | 1,40 | 0 | 1,15 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6U | 1,20 | 0,25 | 0 | 1,25 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6V | 1,15 | 1,40 | 0 | 1,25 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6W | 1,90 | 1 | 0 | 2,05 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 6Z | 2,05 | 1,05 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Nocardiosis</i> | 7B | 1,80 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Protopolybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 7F | 1,15 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Protopolybia</i> | <i>Streptomyces</i> | 7G | 1,40 | 1,40 | 0,15 | 0,2 |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Microbacterium</i> | 8G | 2,10 | 0,65 | 0,1 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Tsukamurella</i> | 8F | 1,90 | 0,85 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Tsukamurella</i> | 8J | 0,63 | 1 | 0 | 1,3 |
| <i>Protopolybia</i> | <i>Streptomyces</i> | 8L | 2,10 | 1,25 | 0 | 2 |
| <i>Polybia</i> | <i>Saccharopolyspora</i> | 8S | 1,52 | 0,83 | 0,53 | 0,63 |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Streptomyces</i> | MA | S | S | S | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Kocuria</i> | MB | S | 0 | 0 | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Microbacterium</i> | MN | S | 0 | 0 | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Microbacterium</i> | MO | S | 0 | S | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Streptomyces</i> | MP | S | S | S | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Nocardiosis</i> | P1A | S | S | S | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Amycolaptosis</i> | P1P | S | S | S | S |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Amycolaptosis</i> | P1S | S | S | S | S |

S= cepas de estudiantes de TFG que presentaron halo de inhibición.

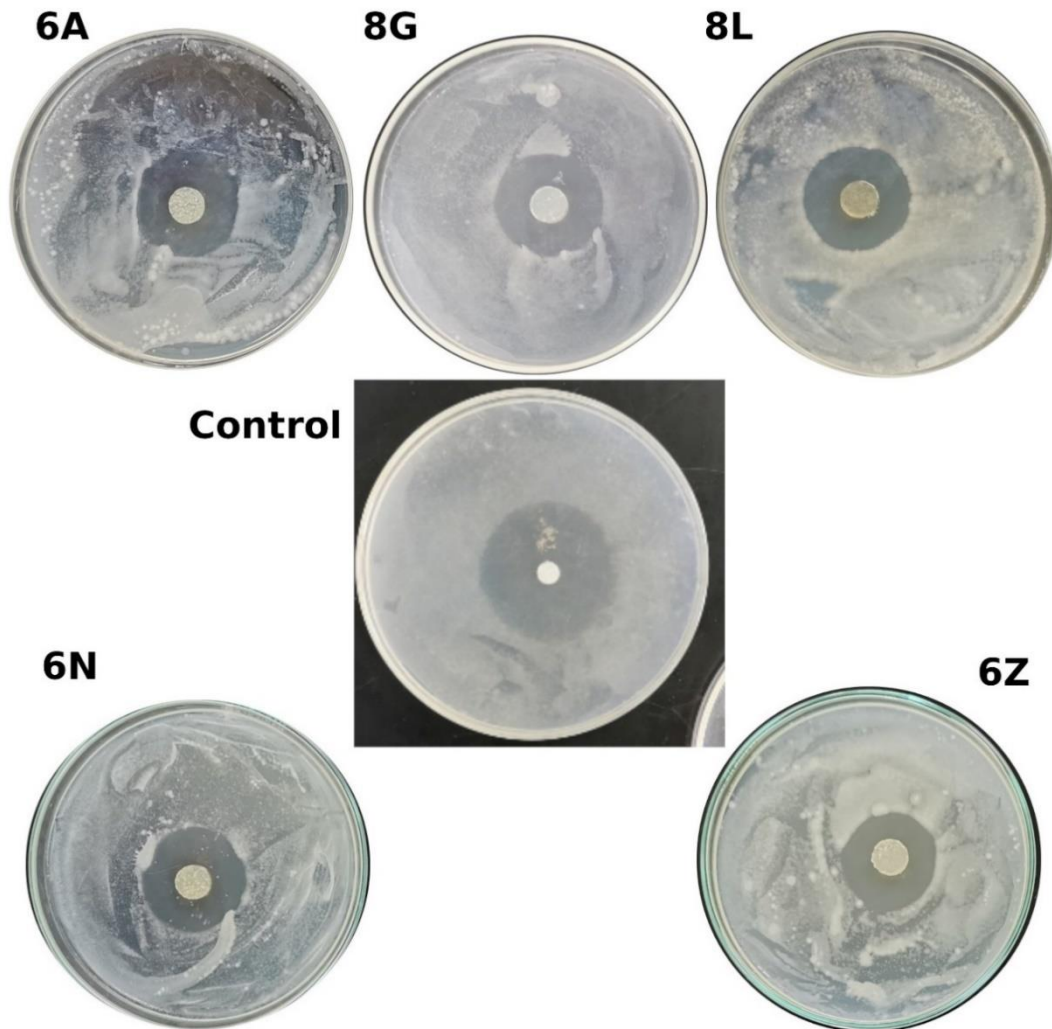


Figura 10. Inhibición del crecimiento de *B. thuringiensis* por algunas de las cepas de actinobacterias (especificadas en la figura) aisladas de los adultos de avispas. El control positivo fue realizado con kanamicina 770IU.

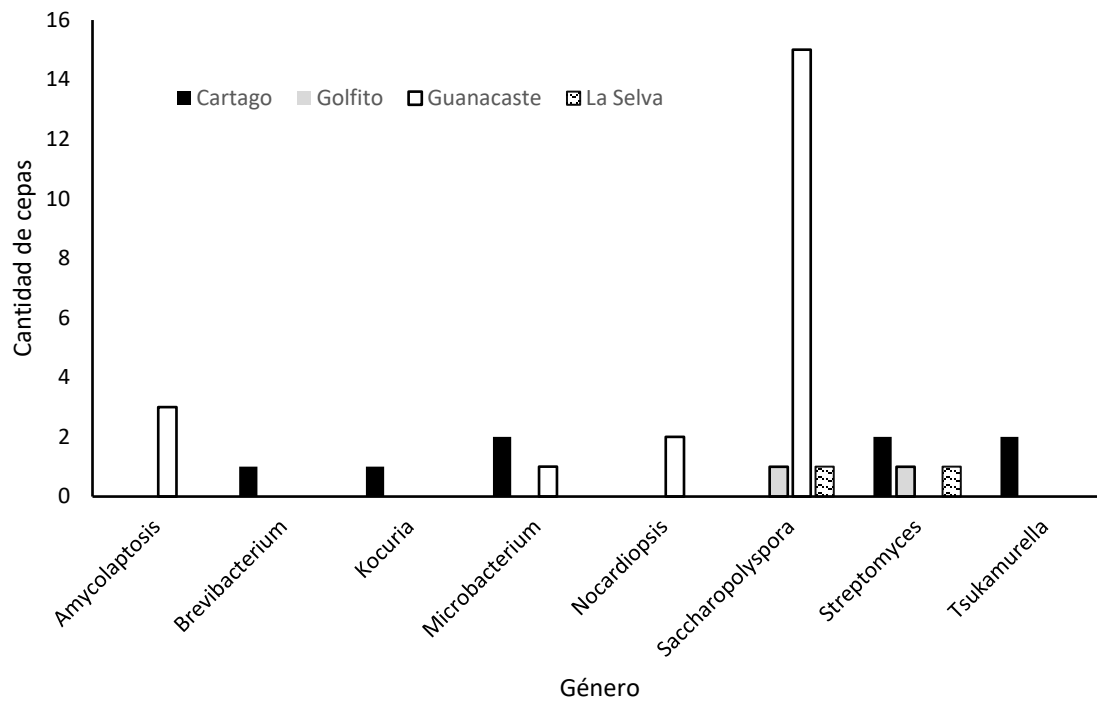


Figura 11. Cantidad de cepas de actinobacterias que inhibieron el crecimiento de *B. thuringensis* según el género y el lugar de donde fueron colectadas.

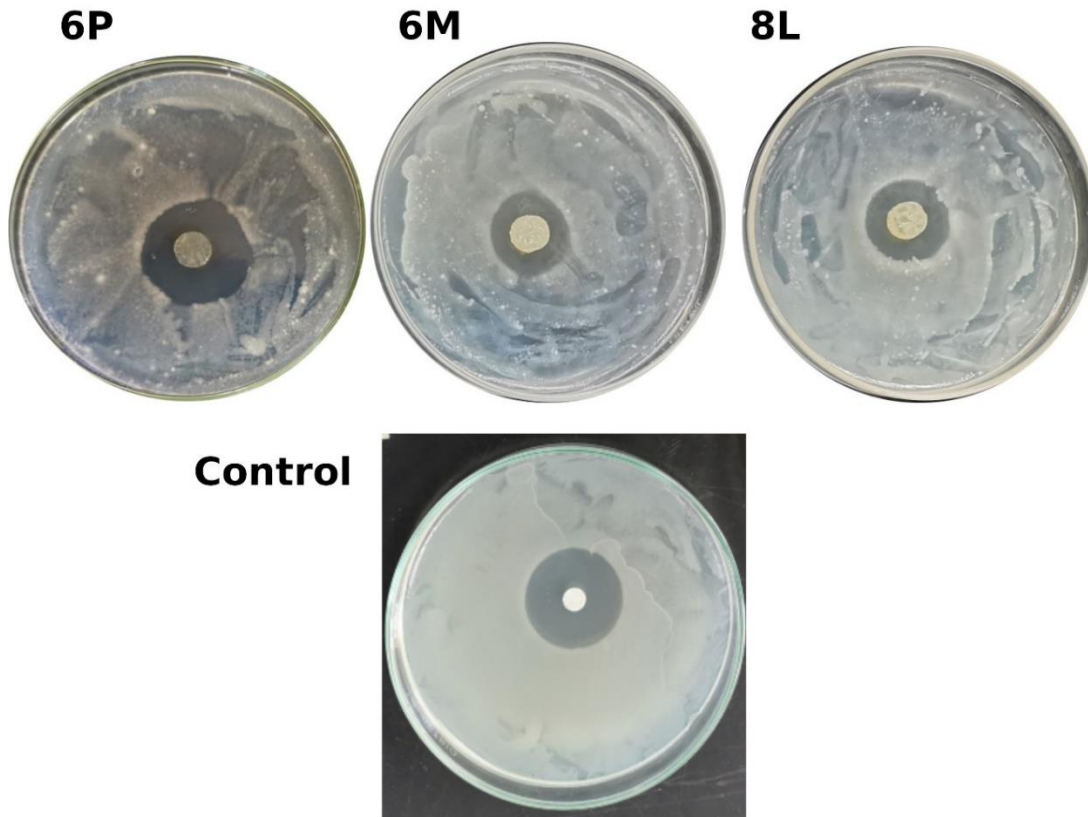


Figura 12. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por algunas de las cepas de actinobacterias (especificadas en la figura) aisladas de los adultos de avispas. El control positivo fue realizado con kanamicina 770IU.

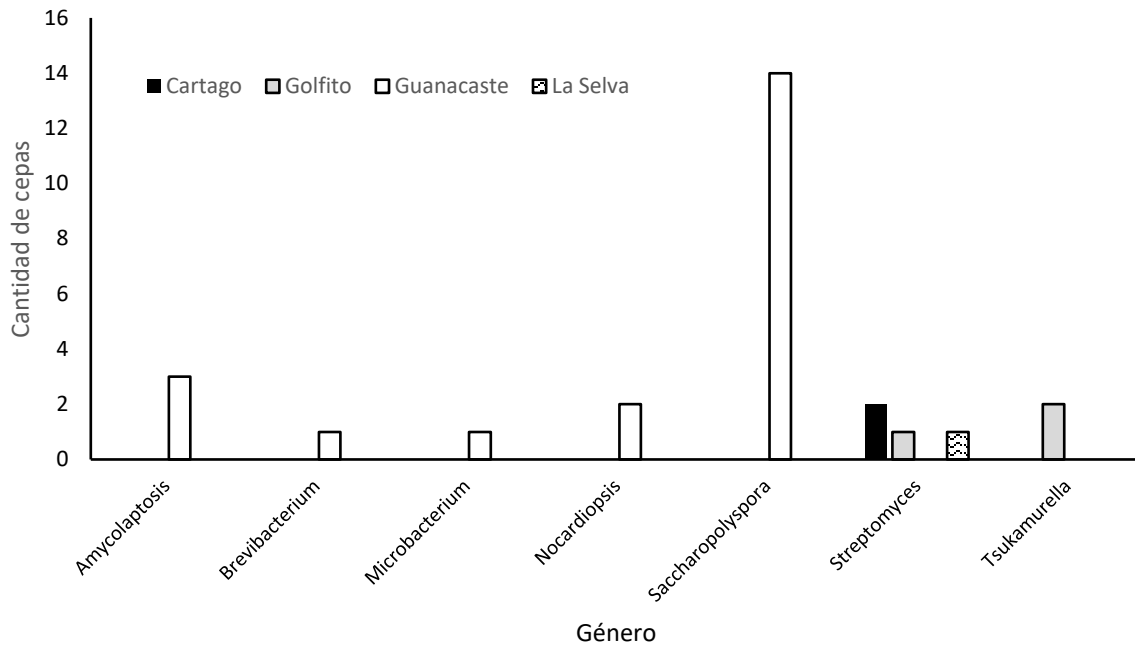


Figura 13. Cantidad de cepas que inhibieron el crecimiento de *E. coli* según el género de avispa y lugar de donde fueron aisladas.

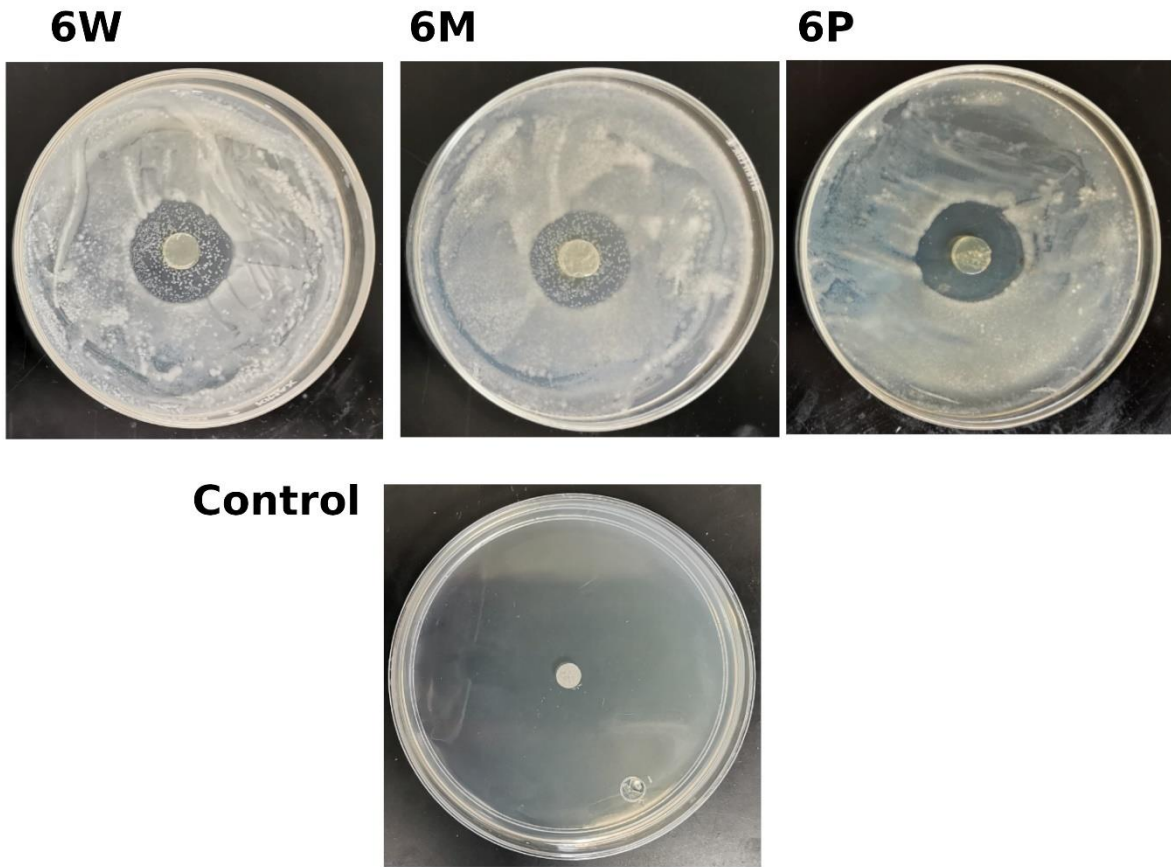


Figura 14. Inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* por algunas de las cepas de actinobacterias (especificadas en la figura) aisladas de los adultos de avispas. El control positivo fue realizado con kanamicina 770IU.

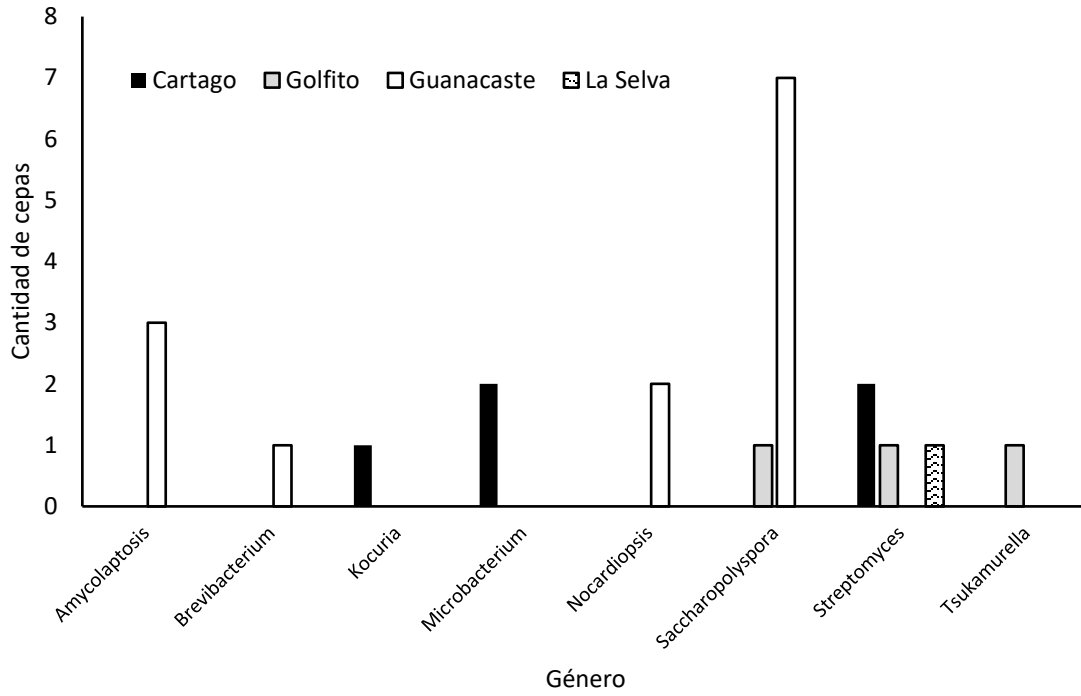


Figura 15. Cantidad de cepas que inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa* según el género de avispa y lugar de donde fueron aisladas.

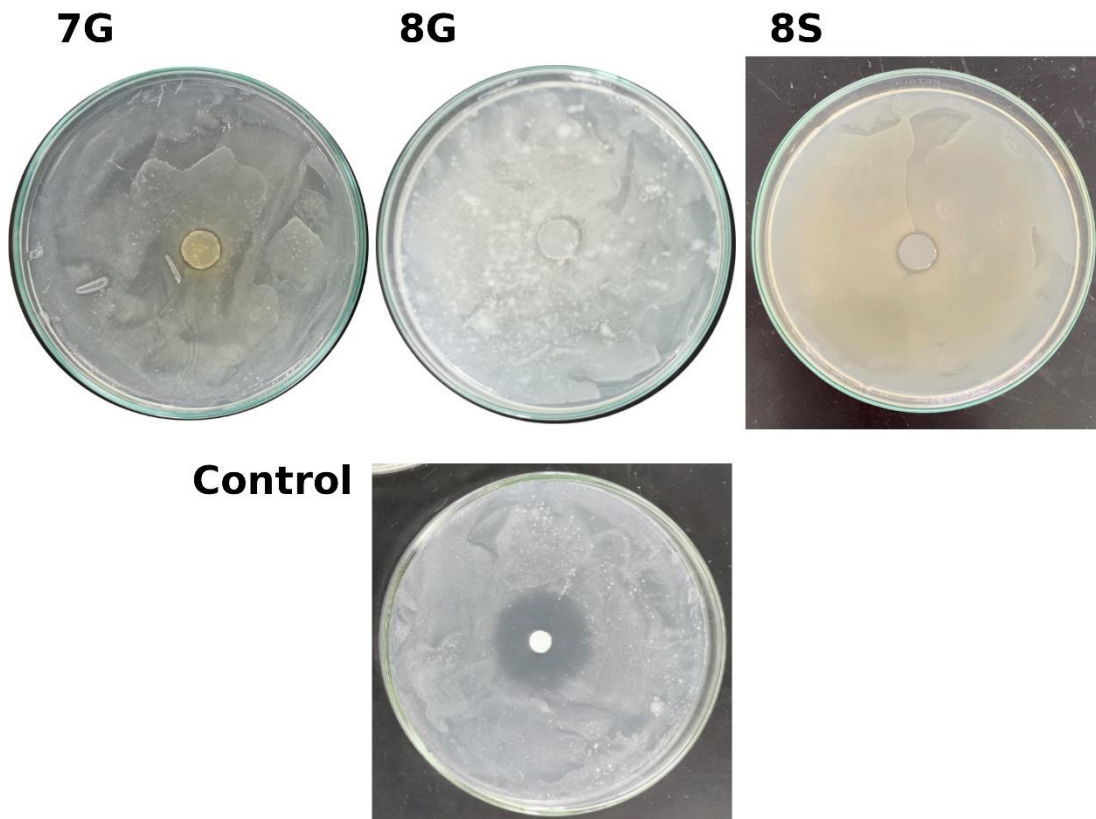


Figura 16. Actividad antibiótica contra *S. aureus* de algunas de las cepas (especificadas en la figura) aisladas de los adultos de avispas.

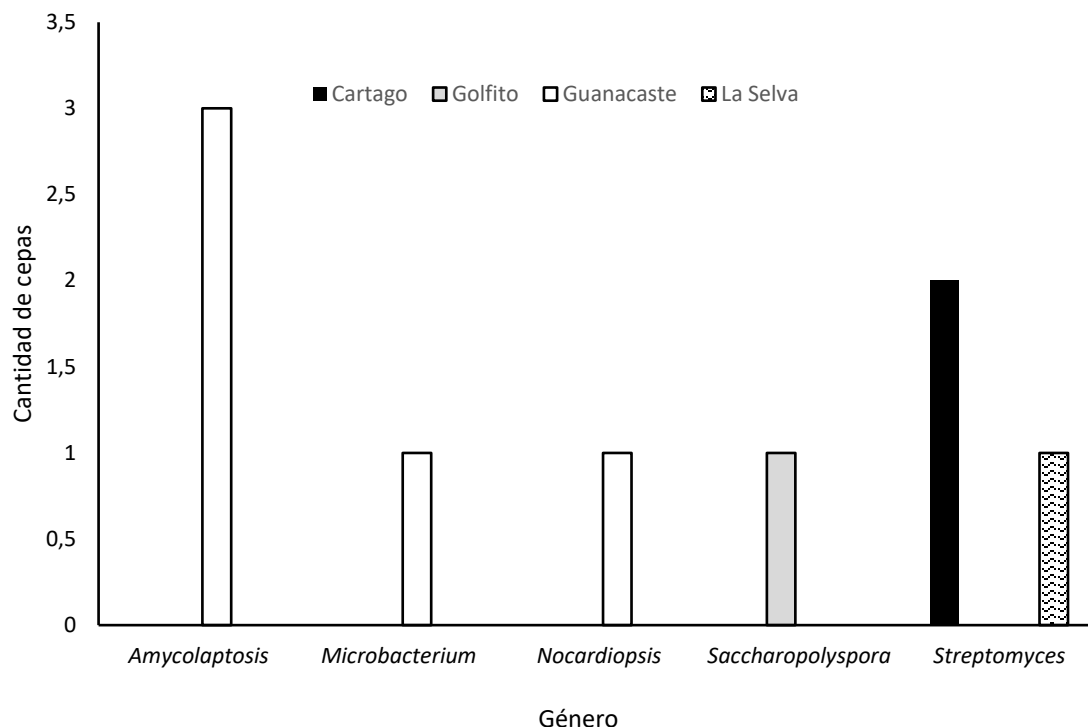


Figura 17. Cantidad de cepas que inhibieron el crecimiento de *S. aureus* según el género de avispa y lugar de donde fueron aisladas.

iii. Aislamiento e identificación de otros microorganismos de los adultos de las avispas

Catorce de las cepas aisladas presentaron similitud morfológica con actinobacterias, sin embargo, al realizar la búsqueda en BLAST tuvieron alta similitud (97% y 99%) con los siguientes géneros del filo Proteobacteria: *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, y *Brevundimonas*; además dos cepas del filo Firmicutes: una del género *Lactobacillus* y otra de *Brevibacillus*. En el proyecto VIE de 2017, se comprobó la inhibición en el crecimiento de los patógenos *B. thuringensis* y *E. coli*, por parte de las cepas de la proteobacteria *Methylobacterium*; por este motivo en este proyecto no se repitieron estas pruebas con las cepas encontradas y solo se documentó su presencia en los adultos muestreados.

La mitad de las cepas de proteobacterias (N=7) inhibieron el crecimiento el *B. thuringensis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (cuadro 4), de las cuales formaron un mayor halo de inhibición contra *B. thuringensis* dos cepas de *Stenotrophomonas* (7U y 7N) y la 8I de *Brevundimonas* (cuadro 4). Contra *E. coli* tres cepas de *Stenotrophomonas* (8B, 7U y 7V) y la cepa de 8I de *Brevundimonas* (8I) y 8M de *Brevibacillus*, formaron un halo de inhibición mayor (cuadro 4). Contra *P. aeruginosa* la cepa 8I de *Brevundimonas* y la 8B de *Stenotrophomonas* formaron le mayor halo de inhibición (cuadro 4). Por otro lado, solo una cepa de *Brevibacillus* (8M) inhibió levemente el crecimiento de *S. aureus* (cuadro 4). La otra mitad de las cepas de proteobacterias junto con una de Firmicutes, no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas patógenas.

Solo una de las cepas (8M) que presentó inhibición fue aislada de adultos de avispas de Golfito, las otras cepas fueron obtenidas de avispas de Guanacaste (fig. 18). Además, la mayor parte de estas cepas se obtuvo de adultos de *Polybia* (cuadro 4).

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento de cuatro cepas patógenas por parte de las cepas de los filos Proteobacteria y Firmicutes aisladas de los adultos de los diferentes géneros de avispas sociales.

| Género Avispa | Actinobacteria | Cepa | Halo de inhibición | | | |
|-----------------------|-------------------------|------|------------------------|----------------|------------------|----------------------|
| | | | <i>B. thuringensis</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| <i>Polybia</i> | <i>Achromobacter</i> | 6C | 1,18 | 0,6 | 0 | 0,58 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Achromobacter</i> | 7I | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 7N | 2 | 0,75 | 0 | 0,20 |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 7O | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Brevundimonas</i> | 7P | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Achromobacter</i> | 7R | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Brevundimonas</i> | 7S | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Parachartergus</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 7T | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 7U | 2,15 | 1,30 | 0 | 0,25 |
| <i>Polybia</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 7V | 0,95 | 1,15 | 0 | 0 |
| <i>Polybia</i> | <i>Lactobacillus</i> | 7X | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Metapolybia</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | 8B | 1,70 | 2,08 | 0 | 2,03 |
| <i>Polybia</i> | <i>Brevundimonas</i> | 8I | 2,10 | 1,15 | 0 | 2,15 |
| <i>Polybia</i> | <i>Brevibacillus</i> | 8M | 1,74 | 1,15 | 0,50 | 0,63 |

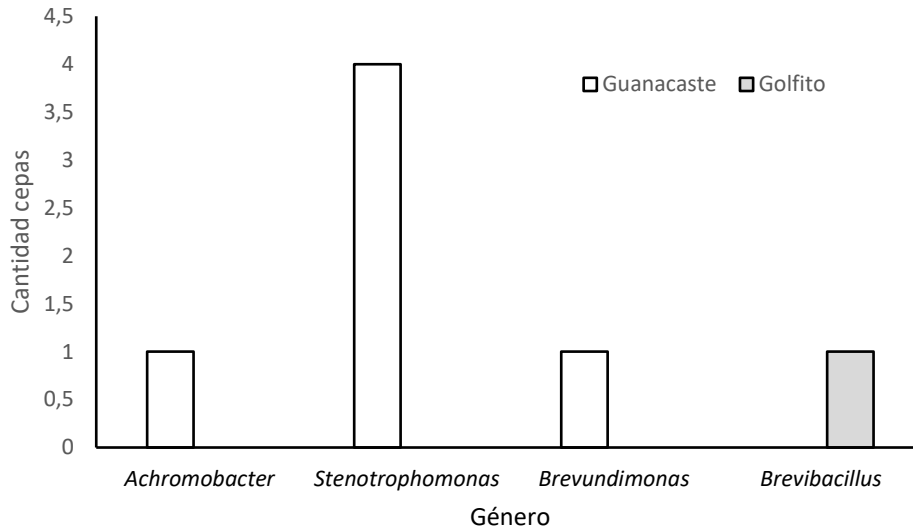


Figura 18. Cantidad de cepas de proteobacterias que inhibieron el crecimiento de algún patógeno según el lugar de donde fueron aisladas.

iv. Secuenciación del ADN de cepas que inhibieron el crecimiento de patógenos

Como parte de la tesis de licenciatura de la estudiante Mariela Gutiérrez se identificaron grupos de genes biosintéticos putativos con similitud a moléculas bioactivas que se han descrito en otros insectos sociales, como: Piericidina A1, Selvamicina, Nystatina, SGRs, entre otros. Este resultado muestra que las cepas de actinobacterias asociadas a avispas, además de inhibir el crecimiento de patógenos, producen compuestos antibióticos que podrían ser utilizados para tratar infecciones.

Al realizar el estudio taxonómico mediante el análisis de la identidad de los nucleótidos basados en el genoma completo (ANI), se encontró una similitud mayor a un 99,2% entre las cepas de *Saccharopolyspora* sp. resultado que se complementó con un árbol filogenético auto-MSLT, donde se observó un agrupamiento de las cepas en clados separados de las demás especies de referencia. Este resultado sugiere que las cepas aisladas de los adultos de avispas podrían tratarse de especies nuevas del género de *Saccharopolyspora*. Los análisis del auto-MSLT y el ANI para el género *Streptomyces* sugirieron que pareciera haber mutaciones entre las cepas en estudio, debido a que se encontraron en clados diferentes y

distantes entre ellas, indicando que también se trata especies distintas. Estos resultados preliminares obtenidos por la estudiante, demuestran el potencial de las cepas asociadas a avispas sociales en la obtención de nuevos compuestos antibióticos, enfatizando la importancia de continuar con esta investigación.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo corresponden al primer estudio en el que se aíslan actinobacterias de la cutícula y glándulas salivales de los adultos avispas de cinco géneros de Epiponini y de cuatro regiones geográficas diferentes en Costa Rica. Además, las cepas aisladas fueron analizadas por pruebas de inhibición antibiótica no solo contra microorganismos patógenos de insectos, también de humanos. Hasta el momento en el país, solo se había realizado un trabajo donde se aislaron actinobacterias de los géneros *Agelaia*, *Polybia* y *Metapolybia*, pero todos fueron obtenidos de un solo lugar de muestreo (Matarrita-Carranza et al., 2017) y la inhibición antibiótica fue medida solo contra patógenos de insectos.

Actinobacterias asociadas a los adultos de avispas

En el proyecto de investigación VIE “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a nidos de avispas sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini)”, se demostró la presencia de actinobacterias en los nidos de avispas eusociales, de forma similar a lo encontrado por Matarrita-Carranza et al. (2017). En el actual proyecto se está demostrando que las actinobacterias no solo están asociadas a la estructura del nido, si no a los adultos, tanto en su cutícula como en las glándulas salivales. Este resultado apoya la hipótesis que se planteó al formular este proyecto, de que la fuente de algunas de las actinobacterias encontradas en las celdas de cría, eran los adultos.

Las cepas de *Saccharopolyspora* encontradas en las celdas de cría probablemente son aportadas por los adultos, principalmente en el caso de los géneros *Metapolybia* sp. y *Polybia* sp., donde fueron encontradas con mayor frecuencia (cuadro 3). Algunas cepas de *Amycolaptosis* encontradas en las celdas de cría de *Parachartergus* sp. también podrían ser

aportadas por los adultos, ya que fueron encontradas solo en este género de avispa en ambos estudios (cuadro 3). Este tipo de asociación es común en la naturaleza ya que según Kaltenpoth (2009) y Seipke et al. (2011) las actinobacterias están presentes en aproximadamente la mitad de las interacciones que mantienen diferentes grupos de insectos para defenderse de patógenos. Por ejemplo, las hormigas cortadoras de hojas (*Atta* y *Acromyrmex*) establecen relaciones con actinobacterias de los géneros *Pseudonocardia* y *Amycolaptosis* (Pseudonocardiaceae) para prevenir infecciones en los jardines fúngicos que cultivan (Currie et al., 1999; Santos et al., 2004; Poulsen et al., 2006). La protección que ofrece las cepas de Pseudonocardiaceae contra el patógeno *Escovopsis* es tan efectiva (Poulsen et al. 2011), que la anatomía de los insectos fue modificada para desarrollar glándulas exocrinas especializadas para albergar estos microorganismos (Poulsen et al., 2003; Currie et al., 2006).

De forma similar a las hormigas cortadoras de hojas, en los adultos de las avispas Epiponini también se encontraron actinobacterias de la familia Pseudonocardiaceae, en este caso *Amycolaptosis* y *Saccharopolyspora*. Es posible que las avispas utilicen estos microorganismos para protección contra patógenos, ya que la mayor parte de las cepas aisladas de estos géneros (66%) inhibieron el crecimiento de *B. thuringensis* (cuadro 3). En general, un 100% de las cepas que inhibieron el crecimiento de algún patógeno, presentaron actividad contra *B. thuringensis*. Estos resultados indican que la presencia de estas cepas en los adultos no es casual y que es probable que estén asociados a las avispas para defenderse de entomopatógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos. Por otro lado, el género *Pseudonocardia* solo fue aislado en las celdas de cría, por lo que posiblemente no está asociado a los adultos.

Otras cepas de actinobacterias podrían estar asociadas exclusivamente a los adultos, ya que no fueron encontradas en las celdas de cría, como: *Brevibacterium*, *Microbacterium* y *Tsakamurella*. *Brevibacterium* es un género que tiene especies asociadas a la piel e intestino de humanos y otros mamíferos, productos lácteos, y suelo principalmente (Collins 2006). En insectos los reportes de *Brevibacterium* hasta el momento han sido pocos, una especie es entomopatógena de escarabajos (Selvakumar et al., 2011), y otra fue obtenida de la cutícula de orugas de *Thaumetopoea pityocampa* (Kati et al., 2010). La cepa de *Brevibacterium*

aislada de la cutícula de adultos, sería el primer reporte para avispa social; que además inhibió el crecimiento de tres microorganismos patógenos incluyendo *B. thuringensis*. De forma similar hay pocos reportes de *Tsukamurella* en insectos (Steinhaus, 1941), se ha encontrado con mayor frecuencia en muestras de suelo, material clínico, y algunas especies son causantes de infecciones cutáneas, meningitis y enfermedades pulmonares en humanos (Goodfellow & Maldonado, 2006). Al igual que con *Brevibacterium*, las cepas encontradas en este estudio serían el primer reporte para avispa social, y es posible que también cumplan una función protectora contra organismos patógenos en la cutícula, ya que inhibieron el crecimiento de *B. thuringensis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Por otro lado, *Microbacterium* es un género que ha sido encontrado en diferentes hábitats: suelo, plantas, insectos, productos lácteos, alimentos, entre otros (Evtushenko & Takeuchi, 2006). En insectos ha sido obtenida principalmente del intestino (Vilanova et al., 2012; Shil et al., 2014; Manfredi et al., 2015; Grigorescu et al. 2018) donde producen una gran variedad de enzimas. Todas las cepas encontradas en este estudio, fueron obtenidas de las glándulas salivales de los adultos, y tres de las cuatro cepas inhibieron el crecimiento de patógenos, donde todas las cepas inhibieron a *B. thuringensis*. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas de *Brevibacterium*, *Microbacterium* y *Tsukamurella*, están asociadas con los adultos de avispa social donde posiblemente cumplen una función defensiva al inhibir todas las cepas el crecimiento del patógeno *B. thuringensis*.

En el caso de otras cepas que fueron encontradas como *Streptomyces*, *Kocuria* y *Nocardiopsis*; es más difícil determinar si están asociadas a los adultos, ya que fueron encontradas en ambos estudios, en el caso de *Streptomyces* y *Kocuria* se aislaron en mayor cantidad de las celdas de cría, y en el caso de *Nocardiopsis* fue poco frecuente en ambos estudios. El género *Streptomyces* engloba un grupo de microorganismos de gran interés médico, ya que se estima que pueden producir hasta 100.000 compuestos antibióticos diferentes (Watve, 2001; Seipke et al., 2011). Muchos de los *Streptomyces* que son utilizados en la industria farmacéutica son obtenidos de muestras de suelo, sin embargo, estudios recientes han determinado que estos microorganismos también pueden vivir en simbiosis con invertebrados, donde al igual que *Pseudonocardia*, son utilizados para protección contra patógenos (Seipke et al., 2011). Cepas de *Streptomyces* se han aislado de invertebrados marinos como las esponjas (Taylor et al. 2007, Kamke et al. 2010), y de invertebrados

terrestres como los insectos (Kaltenpoth et al., 2006, Scott et al., 2008, Haeder et al., 2009; Barke et al., 2010; Seipke et al., 2011). A pesar de su gran potencial, en este estudio solamente se aislaron siete cepas de *Streptomyces* de los adultos, donde cuatro cepas inhibieron el crecimiento de *B. thuringensis*. Este resultado es similar al encontrado en las celdas de cría, donde solo tres cepas de las siete aislada inhibieron el crecimiento de patógenos. Es posible que el bajo porcentaje de inhibición presentado por *Streptomyces* en relación con otras actinobacterias mencionadas anteriormente, se deba a que algunas de las cepas en realidad fueron obtenidas por las avispas del ambiente, y no estaban asociadas a los adultos. Las avispas utilizan plantas como materia prima para la construcción de las celdas de cría (Wenzel, 1998), al encontrarse *Streptomyces* en una gran variedad de hábitats que incluyen las plantas (Seipke et al., 2011), es posible que estas bacterias fueran obtenidas durante el forrajeo y trasladadas por lo adultos accidentalmente. También es posible que estos microorganismos no sean tan buenos competidores en relación con otras cepas encontradas en los adultos, por lo tanto podrían ser desfavorecidas, y que por este motivo no fueran encontradas con tanta frecuencia en la microbiota.

En el caso de las cepas del género *Kocuria*, su presencia ha sido reportada en la polilla *Kunugia latipennis*, donde su presencia aparentemente está relacionada con la degradación de compuestos fenólicos del material vegetal, ya que las larvas que se alimenta de hojas de pino (Paul, Kupar, Bhattacharjee, 2012). La cepa que inhibió el crecimiento de patógenos fue aislada de las glándulas salivales, por lo que similar a *K. latipennis* podría estar presente en las avispas para degradar compuestos alimenticios, pero también para protección contra los patógenos que podrían adquirir de los alimentos, al inhibir el crecimiento de *B. Thuringiensis* y *P. aeruginosa*. En el caso de *Nocardiopsis* se considera que su hábitat natural es el suelo, ya que es donde se ha encontrado con mayor frecuencia, pero también ha sido aislado de glaciares, sedimentos marinos, plantas y en el intestino de animales (Kroppenstedt & Evtushenko, 2006). En el caso de los insectos no ha sido reportado con frecuencia, sin embargo se ha logrado aislar cepas de una especie de escarabajo (Santamaría et al., 2020) y de colonias de *Apis* (Pronuam et al., 2009, Patil et al., 2010). Dos de las tres cepas de *Nocardiopsis* encontradas en este estudio inhibieron el crecimiento de patógenos, este resultado coincide con el obtenido por Santamaría et al. (2020) donde cepas de *Nocardiopsis* aisladas del intestino y heces del escarabajo *Cerambyx welensii*, produjeron compuestos

antimicrobianos contra *Micrococcus luteus* como: picromicina, valinomicina e hihydropicromicina. Al inhibir el crecimiento de varias cepas patógenas (tres patógenos en el caso de la cepa 7G, y cuatro en el caso de la cepa P1A), podríamos suponer que también podrían estar cumpliendo un rol defensivo pero en la superficie externa de los adultos, ya que todas las cepas fueron obtenidas de la cutícula.

Por otro lado, es posible que la presencia de las cepas de *Streptomyces*, *Kocuria* y *Nocardiopsis*, que no presentaron inhibición en el crecimiento de patógenos, no se deba a una relación de simbiosis con las avispas para la producción de compuestos antibióticos, y que su presencia en los adultos sea casual, o que cumpla otro rol. Aunque algunos de las actinobacterias aisladas posiblemente no mantenían una asociación con las avispas, para los insectos en general es ventajoso establecer relaciones con estos microorganismos, ya que según Kaltenpoth (2009) requieren de pocos recursos al ser de crecimiento lento, y al utilizar una gran variedad de sustratos presentan una alta versatilidad metabólica. Estas características de los microorganismos podrían ser ventajosas, al brindar a los insectos la oportunidad de vivir en una gran variedad de hábitats.

En relación con el sitio de colecta, parece que algunas de las cepas obtenidas podrían ser específicas de los adultos de una región. Por ejemplo, las cepas de *Brevibacterium*, *Nocardiopsis* y *Amycolaptosis*, podrían ser favorecidas por el ambiente que se genera en los ecosistemas de Guanacaste ya que solo fueron obtenidas de adultos de esta región (cuadro 2). La mayor parte de las cepas de *Saccharopolyspora* también fueron obtenidas de avispas de Guanacaste, aunque también fueron encontradas dos cepas en La Selva y Golfito (cuadro 2). De forma similar, las cepas de *Tsukamurella* solo fueron aisladas de avispas de Golfito. Otros géneros como *Streptomyces*, *Microbacterium* y *Kocuria* son más generalistas (cuadro 2). La presencia de actinobacterias en cada región depende de varios factores como las especies de plantas, la composición del suelo y la diversidad de microorganismos (Govindasamy et al., 2014; Singh & Dubey, 2018). La composición de plantas en cada región muestreada y por ende la composición del suelo y la comunidad microbiana, es diferente en las cuatro zonas de estudio debido a que las regiones seleccionadas se encuentran en diferentes zonas de vida. En Guanacaste la comunidad vegetal está adaptada a resistir altas temperaturas y poca humedad, por otro lado, en La Selva y Golfito hay mucha humedad y

altas temperaturas, mientras que en Cartago hay una menor temperatura y alta humedad (IMN, 2019). En el caso de este estudio, parece que las condiciones de los ecosistemas de Guanacaste favorecen el establecimiento de una mayor riqueza de géneros de actinobacterias en los adultos de las avispas sociales, aunque se deben realizar más estudios, los resultados indican que las condiciones de los ecosistemas muestreados pueden favorecer o no la presencia de una mayor o menor cantidad de especies de actinobacterias.

En síntesis, aunque en el caso de algunos géneros de actinobacterias es más complicado determinar si los microorganismos están asociados a los adultos o a las celdas, los resultados obtenidos muestran que las actinobacterias pueden asociarse a la cutícula y glándulas salivales de los adultos. Las avispas de Epiponini, al igual que otros insectos sociales, establecen relaciones con actinobacterias y otros microorganismos (Proteobacteria, Firmicutes), para la producción de compuestos antibióticos para defenderse contra el ataque de patógenos. Además, el establecimiento de las relaciones entre avispas y actinobacterias podría estar determinado por el ambiente y la biología de los organismos (Kaltenpoth, 2009). Los nidos de las avispas sociales son vulnerables al ataque de parásitos, por la acumulación del meconia en las celdas de cría (Jeanne, 1991). Dentro de este contexto, las actinobacterias podrían ser esenciales en la supervivencia de la colonia, al brindar protección a los estadios juveniles y adultos. Esta estrategia ha sido utilizada por otras especies de avispas solitarias para proteger sus larvas, como es el caso de *Philanthus triangulum* que alberga actinobacterias en glándulas especializadas de las antenas, y que aplica en la celda antes de la oviposición del huevo (Kaltenpoth et al., 2005 y 2006; Kroiss et al., 2010). Es posible que los adultos de las avispas de Epiponini de forma similar a *P. triangulum*, esterilicen la celda por medio de secreciones de las glándulas salivales aplicadas directamente en la celda, o al rozar su cutícula contra la misma; se ha observado que cuando un individuo completamente desarrollado abandona la celda, las obreras inmediatamente llegan a la misma y permanecen aproximadamente una hora insertando y sacando la cabeza (Nascimento et al., 2004; Chavarría & West-Eberhard, 2010). Además, los adultos por medio de los comportamientos de antenación y la trofalaxis (Nascimento et al., 2004; Chavarría & West-Eberhard, 2010), también podrían pasar los microorganismos entre ellos, aumentando la protección en la colonia.

Actividad antimicrobiana contra patógenos humanos

Como fue explicado anteriormente, muchos de los antibióticos que han sido utilizados para tratar infecciones en los seres humanos, han desarrollado resistencia, principalmente contra aquellos creados de forma sintética (Bode, 2011). Una posible solución contra este problema es utilizar antibióticos de origen natural porque tienen mayor probabilidad de ser efectivos en comparación con los sintéticos (Bode, 2011). Los insectos al vivir en los mismos ambientes que el ser humano, están expuestos al ataque de los mismos patógenos, por este motivo podrían ser una importante fuente de compuestos antibióticos. El argumento anterior es confirmado con los resultados presentados en este estudio, ya que un alto porcentaje de las cepas de actinobacterias que inhibieron patógenos presentó actividad antibiótica contra *E. coli* (88%) y *P. aeruginosa* (67%) patógenos que produce infecciones en humanos. Madden et al. (2013) obtuvieron resultados similares al probar las cepas aisladas de los nidos de *P. dominula* contra *E. coli*, sin embargo, solo un 20% de las cepas inhibió el crecimiento. A pesar de que la inhibición fue baja contra *S. aureus*, los resultados obtenidos muestran que los microorganismos asociados a los adultos de avispas, tienen potencial para la obtención de nuevos compuestos antibióticos. Varios compuestos han sido aislados de los microorganismos asociados a insectos, principalmente de hormigas como: nistatina P1, dentigeromisina, esciloprolactan, candidicina D, y selvamicina (Haeder et al., 2009; Barke et al., 2010; Poulsen et al., 2011; Van Arnem et al., 2016); de escarabajos como la micagimicina (Oh et al., 2009), y de avispas solitarias como la estreptoclorina y derivados de piericidina (Kroiss et al. 2010). Es posible que algunos de estos compuestos también sean producidos por las cepas aisladas de las avispas Epiponini, ya que como se mencionó en la sección de resultados, en el análisis del genoma realizado en la tesis de Licenciatura de la estudiante Mariela Gutiérrez, se encontraron genes similares a los de moléculas antibióticas que se han obtenido de otros insectos sociales como: piericidina, nistatina y selvamicina. Por lo que el potencial para identificar y purificar nuevos compuestos con actividad antibiótica de las cepas obtenidas de avispas sociales en este estudio es muy grande, y será el siguiente paso de esta investigación.

VI. RECOMENDACIONES

Como se mencionó en la discusión, este proyecto fue el segundo paso para determinar la presencia de actinobacterias en los nidos de avispas Neotropicales, y determinar su actividad antimicrobiana. Debido a los resultados positivos que se obtuvieron en este proyecto es importante continuar la investigación, por este motivo, se pretende caracterizar los metabolitos antibióticos de las cepas que presentaron inhibición contra patógenos, donde se ha conformado un grupo de trabajo interdisciplinario que incluye colaboración de la investigadora PhD. Kattia Nuñez del CIB, PhD. Javier Pizarro del Instituto Pasteur, así como del PhD. Robert J. Capon y PhD. Zeinab Khalil Instituto de Biociencia Molecular, Universidad de Queensland, Australia; para aislar e identificar los compuestos antibióticos y evaluar su uso en la industria farmacéutica. Además, sería importante hacer pruebas de inhibición también contra patógenos de cultivos, ya que también podrían tener potencial para inhibir su crecimiento de estos microorganismos que atacan cultivos.

VII. AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del ITCR por el financiamiento para la realización de este estudio. A los estudiantes: Norman Aguilar, Mariela Gutiérrez, Pablo Jiménez, Nathaly Martínez, Ivonne Rodríguez, Daniela Salas e Itnan Vargas, por la asistencia brindada durante el desarrollo de este proyecto. A Mariela Gutiérrez por todo el trabajo realizado durante su TFG de Bachillerato y Licenciatura, donde obtuvo resultados muy interesantes que aportaron mucho al proyecto. A la PhD. Kattia Núñez por toda la ayuda brindada a Mariela Gutiérrez para el análisis del genoma de las cepas. Al PhD. Javier Pizarro Cerda del Instituto Pasteur de París, por la secuenciación del genoma de algunas de las cepas obtenidas. A Pablo Jiménez por el trabajo realizado durante su TFG de Bachillerato que también aportó resultados importantes al proyecto. A Ana Laura Agüero, David García, Rossy Guillén y Luis Barboza del CIB por la ayuda brindada, y la disposición de auxiliar a los asistentes cuando lo necesitaron. Al Dr. Carlos Chacón Díaz de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por la donación de las cepas patógenas para

realizar las pruebas de inhibición. A Sergio Jansen González por la asistencia brindada durante la colecta de los nidos, y el soporte emocional.

VIII. REFERENCIAS

- Anandan, R., Dharumadurai, D., y Manogaran, P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. En: D. Dhanasekaran & Y. Jiang (Eds.). *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* (3-37). Rijeka, Croatia: InTech.
- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M., y Corby-Harris, V. (2013). Microbial Ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8(12), e83125. doi:10.1371/journal.pone.0083125.
- Barke, J., Seipke, R.F., Gruschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M.J., Goss, R.J.M., Yu, D.W., y Hutchings, M.I. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol*, 8, 109.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385-395.
- Bode, H.B. (2011). Insect-Associated Microorganisms as a Source for Novel Secondary Metabolites with Therapeutic Potential. En A. Vilcinskas. (Ed). *Insect Biotechnology* (123-144). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Bos, J., & Austin, R. (2018). A bacterial antibiotic resistance accelerator and applications. *Methods In Cell Biology*, 41-57. doi: 10.1016/bs.mcb.2018.06.005
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Brough, E.J. (1983). The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 42(3), 306-311.
- Čerövský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Hulačová, H., Borovičková, L., Jezěk, R., y Bednárova, L. (2008). New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptides*, 29, 992-1003.

- Chavarría, L., y West-Eberhard, M.J. (2010). The behavior and natural history of *Chartergellus*, a little-known genus of neotropical social wasps (Vespidae Polistinae Epiponini). *Ethology Ecology & Evolution*, 22(4), 317–43.
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2019). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal Of Molecular Evolution*, 88(1), 26-40. doi: 10.1007/s00239-019-09914-
- Chun, J., y Goodfellow, M. (1995). A phylogenetic analysis of genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematics Bacteriology*, 45(2), 240-245.
- Clardy, J., Fischbach, M., & Currie, C. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 19(11), R437-R441. doi: 10.1016/j.cub.2009.04.001
- Collins, M.D. (2006). The genus *Brevibacterium*. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. (Eds.), *The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria* (3). Singapore: Springer.
- Corby-Harris, V., Maes, P., y Anderson, K.E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, 9(4), e95056. doi:10.1371/journal.pone.0095056.
- Currie, C.M., Scott, J.A., Summerbell, R.C., y Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398, 701-704.
- Currie, C.R., Poulsen, M., Mendenhall, J., Boomsma, J.J., y Billen, J. (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, 311, 81–83.
- de Alcântara Rodrigues, I., Ferrari, R., Panzenhagen, P., Mano, S., & Conte-Junior, C. (2020). Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods. *Advances In Applied Microbiology*, 143-183. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.03.001
- Evtushenko, L.I. & Takeuchi, M. (2006). The family Microbacteriaceae. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. (Eds.), *The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria* (3). Singapore: Springer.
- Fukuda, T.T.H., Helffrinch, E.J.N., Mevers, E., Melo, W.G.P., Var Arnam, E.B., Andes, D.R., Currie, C.R., Pupo, M.T. & Clardy, J. (2021). Specialized metabolites reveal evolutionary history and geographic dispersion of a multilateral symbiosis. *ACS Central Science*, 7: 292-299.
- Graystock, P., y Hughes, W.O.H. (2011). Disease resistance in a weaver ant, *Polyrhachis dives*, and the role of antibiotic-producing glands. *Behavior, Ecology, Sociobiology*, 65, 2319-2327.

- Goodfellow, M., y Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 37, 189–216.
- Goodfellow, M. & Maldonado, L.A. (2006). The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. (Eds.), *The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria* (3). Singapore: Springer.
- Govindasamy, V., Franco, C.M.M., Gupta, V.V.S.R. (2014). Endophytic Actinobacteria: Diversity and Ecology. En: V.C. Verma, A.C. Gange (Eds). *Advances in Endophytic Research*. India: Springer. DOI 10.1007/978-81-322-1575-2_2.
- Grigorescu, A.S., Renoz, F., Sabri, A., Foray, V., Hance, V. & Thonart, P. (2018). Accessing the Hidden Microbial Diversity of Aphids: an Illustration of How Culture-Dependent Methods Can Be Used to Decipher the Insect Microbiota. *Microbial Ecology*, 75: 1035-1048.
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2009). Candicidin-producing *Streptomyces* support leafcutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus Escovopsis. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 4742–4746.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamilton, W.D. (1964). The genetical theory of social behavior. *Journal of Theoretical Biology*, 7, 1-52.
- Hamilton, C., Lay, F., y Bulmer, M.S. (2011). Subterranean termite prophylactic secretions and external antifungal defenses. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1259-1266.
- Huddleston, J. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection And Drug Resistance*, 167. doi: 10.2147/idr.s48820
- Instituto Metereológico Nacional de Costa Rica (3 de Agosto 2021). Estaciones automáticas. <https://www.imn.ac.cr/estaciones-automaticas>
- Jeanne, R.L. (1991). The swarm founding Polistinae. En: K.G. Ross y R.W. Matthews. (Eds.), *The social biology of wasps* (7-29). Ithaca, USA: Cornell University.
- Kaltenpoth, M., Goettler, W., Herzner, G., y Strohm, E. (2005). Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Current Biology*, 15, 475-479.
- Kaltenpoth, M., Goettler, W., Dale, C., Stubblefield, J.W., Herzner, G., Roeser-Mueller, K., y Strohm, E. (2006). ‘*Candidatus Streptomyces philanthi*’, an endosymbiotic streptomycete

in the antennae of *Philanthus digger* wasps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1403-1411.

Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists; general healthcare for insects? *Trends in microbiology*, 17(12), 529-535.

Kamke, J., Taylor, M.W., y Schmitt, S. (2010). Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *ISME J*, 4, 498-508.

Kati, H., Ince, I.A., Demis, I. & Demirbag, Z. (2010). *Brevibacterium pityocampae* sp. nov., isolated from caterpillars of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 312-316.

Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Schneider, B., Schwinger, M.G., Hertweck, M.G., Maddula, R.K., Strohm, E., y Svatoš, A. (2010). Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nature Chemical Biology*, 6, 261-263.

Kroppenstedt, M. R. & Evtushenko, L.I. (2006). The Family Nocardiothrales. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. (Eds.), *The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria* (3). Singapore: Springer.

Landolt, P., & Akre, R. (1979). Occurrence and Location of Exocrine Glands in Some Social Vespidae (Hymenoptera). *Annals Of The Entomological Society Of America*, 72(1), 141-148. doi: 10.1093/aesa/72.1.141

Lawson, P. (2018). The Phylum Actinobacteria. *The Bifidobacteria And Related Organisms*, 1-8. doi:10.1016/b978-0-12-805060-6.00001-6

Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M., Kämpfer, P., & Whitman, W. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey'S Manual® Of Systematic Bacteriology*, 1-28. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4_1

Madden, A.A., Grassetti, A., Soriano, A.N., y Starks, P.T. (2013). Actinomycetes with Antimicrobial Activity Isolated from Paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) Nests. *Environmental Entomology*, 42(4), 703-710.

Manfredi, A.P., Pertti, Ni., Martínez, M.A. (2015). Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *Journal of Basic Microbiology*, 55: 1384-1393. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500269>

Matarrita-Carranza, B., Moreira-Soto, R.D., Murillo-Cruz, C., Mora, M., Currie, C.R., y Pinto Tomas, A.A. (2017). Evidence for widespread associations between Neotropical Hymenopteran Insects and Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-17.

Morh, K.I., y Tebbe, C.C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apodeia) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8(2), 258-272.

Mortari, M.R., do Couto, L.L., dos Anjos, C.L., Mourão, C.B.F., Camargos, T.S., Vargas, J.A.G., y Schwartz, F.E. (2012). Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon*, 59(1), 163-170.

Nascimento, F.S., Tannure-Nascimento, I.C. & Zucchi, R. (2004). Behavioral mediators of cyclical oligogyny in the Amazonian swarm-founding wasp *Asteloeca ujhelyii* (Vespidae, Polistinae, Epiponini). *Insectes Sociaux*, 51(1),17–23.

Noll, F.B. (2005). Reproductive caste in neotropical swarming wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini): A comprehensive analysis. *Trends Entomol*, 4, 59-66.

Noll, F.B., y Wenzel, J.W. (2008). Caste in the swarming wasps: “queenless” societies in highly social insects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(3), 509–22.

Oh, D.C., Scott, J.J., Currie, C.R., y Clardy, J. (2009). Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp. *Org Lett*, 11, 633–636.

Paul, D., Kupar, T., Bhattacharjee, A. (2012). Phylogenetic analysis of a gut bacteria of pine caterpillar: *Kunugia latipennis*. Walker. *BTAIJ*, 6(12), [367-374]. ISSN: 0974 - 7435

Park, T., Yu, M., Kim, H., Cho, H., Hwang, M., & Yang, H. (2014). Characteristics of actinomycetes producing geosmin in Paldang Lake, Korea. *Desalination And Water Treatment*, 57(2), 888-899. doi: 10.1080/19443994.2014.970583

Patil, P.B., Zeng, Y., Coursey, T., Houston, P., Miller, I. & Chen, S. (2010). Isolation and characterization of *Nocardiopsis* sp. from honeybee guts. *FEMS Microbiology Letters*, 312:110-118.

Penagos-Arévalo, A., Billen, J., & Sarmiento, C. (2015). Uncovering head gland diversity in neotropical Polistinae wasps (Hymenoptera, Vespidae): Comparative analysis and description of new glands. *Arthropod Structure & Development*, 44(5), 415-425. doi: 10.1016/j.asd.2015.06.002

Perez, J., Araya-Valverde, E., Garro, G., y Abdelnour-Esquivel, A. (2017). Analysis of stress indicators during cryopreservation of seeds of Landrace Maize (*Zea mays*). *Cryoletters*, 38(6), 445-454.

Pérez, J., Contreras-Moreno, F., Marcos-Torres, F., Moraleda-Muñoz, A., & Muñoz-Dorado, J. (2020). The antibiotic crisis: How bacterial predators can help. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 18, 2547-2555. doi: 10.1016/j.csbj.2020.09.010

Poulsen, M., Bot, A.N.M., y Boomsma, J.J. (2003). The effect of metapleural gland secretion on the growth of mutualistic bacterium of leaf-cutting ants. *Naturwissenschaften*, 90, 406-409.

Poulsen, M., Hughes, W.O.H., y Boomsma, J.J. (2006). Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. *Insectes Sociaux*, 53, 349-355.

Poulsen, M., Oh, D.C., Clardy, J., y Currie, C.R. (2011). Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS ONE*, 6, e16763.

Proumnuan, Y., Kudo, T., y Chantawannakul, P. (2009). Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1685-1689.

Ramasamy, D., Mishra, A.K., Lagier, J.C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D., y Fournier, P.E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 384–391.

Rocha, T., de Souza, B.M., Palma, M.S., y Cruz-Höfling, M.A. (2007). Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. *Toxicon*, 50(5), 589-599.

Rosengaus, R.B., Maxmen, A.B., Coates, L.E., y Traniello, J.F.A. (1998). Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termitidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44, 125-134.

Santamaría, R., Martínez, A., Sánchez, R., Torres, L., Bonal, R., Martín, J., Tormo, R., ... Díaz, M. (2020). Characterization of Actinomycetes Strains Isolated from the Intestinal Tract and Feces of the Larvae of the Longhorn Beetle *Cerambyx welensii*. *Microorganisms*, 8. Doi: 10.3390/microorganisms8122013

Santos, A.V., Dillon, R.J., Dillon, V.M., Reynolds, S.E., y Samuels, R.I. (2004). Occurrences of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia sp.* in colonies of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 319-323.

Scott, J.J., Oh, D.C., Yuceer, M.C., Klepzig, K.D., Clardy, J., y Currie, C.R. (2008). Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science*, 322, 63.

Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., y Hutchings, M.I. (2011). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Rev*, 36, 862-876.

Selvamukar, G., Sushil, S.N., Stanley, J., Mohan, M., Deol, A., Rai, D., Bhatt, R.J.C. & Gupta, H.S. (2011). *Brevibacterium frigoritolerans* a novel entomopathogen of *Anomala dimidiata* and *Holotrichia longipennis* (Scarabaeidae: Coleoptera). *Biocontrol, Science and Technology*, 21(7): 821-827, doi: 10.1080/09583157.2011.586021

- Shah, A., Shakeel-u-Rehman, Hussain, A., Mushtaq, S., Rather, M., & Shah, A. (2017). Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. *Microbial Pathogenesis*, *110*, 93-99. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.017
- Singh, R. & Dubey, A.K. (2018). Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Frontiers in Microbiology*, *9*.
- Stach, J., Maldonado, L., Ward, A., Goodfellow, M., & Bull, A. (2003). New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, *5*(10), 828-841. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x
- Steinhaus, E. A. (1941). A study of the bacteria associated with thirty species of insects. *J. Bacteriol*, *42*: 757–790.
- Shil, R.K., Mojumder, S., Sadida, F.F., Uddin, M., Sikdar, D. (2014). Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of three phytophagous insect species. *Biological and Applied Science*, *57*(6). doi:0.1590/S1516-8913201402620
- Stow, A., Briscoe, D., Gillings, M., Holley, M., Smith, S., & Leys, R. et al. (2007). Antimicrobial defences increase with sociality in bees. *Biology Letters*, *3*(4), 422-424. doi: 10.1098/rsbl.2007.0178
- Stow, A., y Bettie, A. (2008). Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. *Brain, Behavior and Immunity*, *22*, 1009-1013.
- Sullivan, C.B., Diggle, M.A., y Clarke, S.C. (2005). Multilocus sequence typing: data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol Biotechnol*, *29*, 245–254.
- Taylor, M.W., Hill, R.T., Piel, J., Thacker, R.W., y Hentschel, U. (2007). Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. *ISME J*, *1*, 187–190.
- Tranter, C., Graystock, P., Shaw, C., Lopes, J.F.S., y Hughes, W.O.H. (2014). Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *68*, 499-507.
- Turillazzi, S., Perito, B., Pazzagli, L., Pantera, B., Gorfer, S., y Tancredi, M. (2004). Antibacterial activity of larval saliva of the European paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Sociaux*, *51*, 339-341.
- Ul-Hassan, A., & Wellington, E. (2009). Actinobacteria. *Encyclopedia Of Microbiology*, 25-44. doi:10.1016/b978-012373944-5.00044-4
- Van Arnam, E.B., Ruzzini, A.C., Sit, C.S., Horn, H., Pinto-Tomás, A.A., Currie, C.R., y Clardy, J. (2016). Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *PNAS*, *113*(46), 12940-12945.

Veal, D.A., Trimble, J.E & Beattie, A.J. (1992). Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (the Australian bull ant). *Journal of Applied Microbiology*, 72(3), 188-194.

Verma, E., Chakraborty, S., Tiwari, B., & Mishra, A. (2018). Antimicrobial Compounds From Actinobacteria. *New And Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering*, 277-295. doi: 10.1016/b978-0-444-63994-3.00019-9

Vilanova, C., Marco, G., Domínguez-Escribá, L., Genovés, S., Sentandreu, V., Bataller, E., Ramón, D. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes. *Biomass and Energy*, 45: 288-294.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., y Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol*, 176, 386–390.

Wenzel, J.W. (1998). A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). *American Museum Novitates*, 3224, 39.

Wenzel, J.W., y Carpenter, J.M. (1994). Comparing methods: adaptive traits and tests of adaptation. En: P. Eggleton y R. Vane-Wright. (Eds). *Phylogenetics and Ecology* (pp 79-101). London: Academic Press.

West-Eberhard, M.J. 1982. The Nature and Evolution of swarming in Tropical Social Wasps (Vespidae, Polistinae, Polybiini). En: P. Jaisson (Ed). *Social Insects in the Tropics* (pp 97-128). Paris: Université Paris XIII Press.

World Health Organization. (2014). Antimicrobial Resistance: global report of surveillance. France. Recuperado de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf

Zhang, W., Li, J., Liu, L.W., Wang, K.R., Song, J.J., Yan, J.X., Li, Z.Y., Zhang, B.Z., y Wang, R. (2010). A novel analog of antimicrobial peptide *Polybia*-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice. *Peptides*, 31(10), 1832-1838.

Zhang, L., Zeng, Q., Liu, X., Chen, P., Guo, X., & Ma, L. et al. (2019). Iron reduction by diverse actinobacteria under oxic and pH-neutral conditions and the formation of secondary minerals. *Chemical Geology*, 525, 390-399. doi: 10.1016/j.chemgeo.2019.07.038

IX. ANEXO: ARTICULO SOMETIDO PARA PUBLICACIÓN

Draft genome sequences of *Saccharopolyspora sp.* 6M, 6T, 6V, 7B, and *Streptomyces sp.* 7G, 8L strains isolated from social wasps (Vespidae; Polistinae: Epiponini).

Mariela Gutiérrez-Araya^a; Kattia Núñez-Montero^{a,b}; Javier Pizarro-Cerda^c; Laura Chavarría-Pizarro^{a*}

^aCentro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

^bLaboratorio de Biología Molecular Aplicada, Centro de Excelencia en Medicina Traslacional, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

^cUnité de Recherche Yersinia, Institut Pasteur, Paris, France

*Address correspondence to Laura Chavarría-Pizarro: e-mail laura.chavarria@itcr.ac.cr

ABSTRACT

Strains of the genus of *Saccharopolyspora* and *Streptomyces* were isolated from *Polybia* sp. a *Metapolybia* sp. social wasps in Costa Rica. Draft genome sequences from six isolated were obtained ranging from 6.4Mb to 9.1Mb in length and 71-73% GC content.

ANNOUNCEMENT

The under-explored sources of natural products have revitalized the interest of scientists, and those include new bacterial strains from social insects as promising source of novel molecules [1]. The interest in these microbes is due to their ability to adapt and compete with a broad spectrum of insect pathogens, which has allowed their evolutionary success over the time [2], and might provide them with an untapped diversity of metabolites. Under this premise, *Saccharopolyspora* sp., and *Streptomyces* sp. symbiotic strains associated with social wasps *Metapolybia* sp. and *Protopolybia* sp. were isolated.

Cuticle and salivary glands of the social wasps were collected from the Biological Base La Selva; and Santa Cruz, Guanacaste in Costa Rica; and directly placed on ISP-1 and ISP-2 agar plates supplemented with nystatin (0,1%) and nalidixic acid (10ug/ml) for Actinobacteria isolation. Genomic DNA from the pure isolates of six strains was obtained using the phenol/chloroform extraction described for Chun & Goodfellow [3]. Genomic libraries were prepared with Nextera XT DNA Library Preparation kit (Illumina) and sequenced using a paired-end strategy of 2×150 nucleotides on the Illumina NextSeq500 platform (Illumina, San Diego, United States). Total reads were filtered with Fastp v.0.20.1 [4] using default parameters and the quality of the sequences was verified with FastQC v.0.11.9 [5]. *De novo* assemblies were obtained from trimmed reads with CLC Genomics Workbench 9 (Qiagen, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics->

[workbench](#)) and the quality of assembled genomes was carried out with CheckM v1.1.3 [6].

Taxonomic comparison was made with JSpeciesWS [8] by calculation of the Average Nucleotide Identity (ANI) against available genomes of the closest genus (Table1).

Six draft genomes were obtained with over 98x coverage, showing lengths from 6.4Mb to 9.1Mb in up to 1081 contigs, N50 from 15698 to 50652, and completeness above 98% (Table 1). The GC content ranged from 71% to 73%, while the taxonomic affiliation through ANI showed four *Saccharopolyspora sp.* sharing >99% genome identity among them and two different *Streptomyces sp.* isolates, however none of the comparisons showed results above species threshold (>95%) with available genomes of the genera, suggesting that these isolates might be a new species.

Table 1. Sequencing general results for six Actinobacteria isolates associated with social wasp.

| Strain code | Source | Closest taxon* | Total reads | Genome size (bp) | % GC | Contigs | N50 | Completeness (%) | Contamination (%) | Coverage (x) |
|-------------|---|------------------------------|-------------|------------------|------|---------|--------|------------------|-------------------|--------------|
| 6M | Cuticle <i>Metapolybia sp.</i> | <i>Saccharopolyspora sp.</i> | 3 666 716 | 6 438 697 | 73 | 360 | 29 651 | 99,65 | 1,48 | 100 |
| 6T | Cuticle <i>Metapolybia sp.</i> | <i>Saccharopolyspora sp.</i> | 3 360 137 | 6 587 366 | 72 | 355 | 38 839 | 99,47 | 1,45 | 98 |
| 6V | Cuticle <i>Metapolybia sp.</i> | <i>Saccharopolyspora sp.</i> | 9 098 285 | 6 571 055 | 72 | 242 | 50 652 | 99,47 | 1,12 | 112 |
| 7B | Cuticle <i>Metapolybia sp.</i> | <i>Saccharopolyspora sp.</i> | 6 180 123 | 6 480 769 | 73 | 291 | 40 461 | 99,82 | 1,45 | 107 |
| 7G | Salivary Gland <i>Protopolybia sp.</i> | <i>Streptomyces sp.</i> | 3 972 042 | 7 848 592 | 71 | 1081 | 12 009 | 99,33 | 1,99 | 99 |
| 8L | Cuticle <i>Protopolybia sp.</i> | <i>Streptomyces sp.</i> | 5 797 969 | 9 078 753 | 71 | 991 | 15 698 | 98,19 | 2,17 | 103 |

*Based on ANI comparison with available species of the closest genus.

Data availability. This project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the. Bioproject accession [PRJNA764377](#).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by Instituto Tecnológico de Costa Rica, project VIE-1510090 and 1510143; and P2M platform of the Instituto Pasteur, París, Francia. We thank CONAGEBIO for the collection permits: R-CM-ITCR-001-2019-OT and R-CM-ITCR-002-2019-OT.

REFERENCES

- [1] E. N. Sholkamy, P. Muthukrishnan, N. Abdel-Raouf, X. Nandhini, I. B. M. Ibraheem, and A. A. Mostafa, "Antimicrobial and antinematocidal metabolites from *Streptomyces cuspidosporus* strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 27, no. 12, pp. 3208–3220, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.043.
- [2] M. Halim *et al.*, "Exploring the abundance and DNA barcode information of eight parasitoid wasps species (Hymenoptera), the natural enemies of the important pest of oil palm, bagworm, *Metisa plana* (Lepidoptera: Psychidae) toward the biocontrol approach and it's application in Malaysia," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 21, no. 4, pp. 1359–1365, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.aspen.2018.10.012.
- [3] J. Chun and M. Goodfellow, "A Phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardia* with 16s rRNA Gene Sequences," International Union of Microbiological Societies, 1995.
- [4] S. Chen, Y. Zhou, Y. Chen, and J. Gu, "Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor," in *Bioinformatics*, Sep. 2018, vol. 34, no. 17, pp. i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- [5] Andrews S, "A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>," 2010.
- [6] D. H. Parks, M. Imelfort, C. T. Skennerton, P. Hugenholtz, and G. W. Tyson, "CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes," *Genome Research*, vol. 25, no. 7, pp. 1043–1055, Jul. 2015, doi: 10.1101/gr.186072.114.
- [7] R. K. Aziz *et al.*, "The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology," *BMC Genomics*, vol. 9, Feb. 2008, doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- [8] M. Richter, R. Rosselló-Móra, F. Oliver Glöckner, and J. Peplies, "JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 6, pp. 929–931, Mar. 2016, doi: 10.1093/bioinformatics/btv681.