



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

**BIOPROSPECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN  
MICROORGANISMOS ANTÁRTICOS**

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister en  
Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento**

**Presentado por:**

**Jeffrey David Vargas Perez**

**Guayaquil – Ecuador**

**2023**

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me apoyaron durante mi proyecto de investigación. En primer lugar, a mi tutora, Ph.D. Nardy Diez, por ser una fuente constante de motivación y guía durante mi carrera de maestría. A los doctores, Daynet Sosa y Christian Abraham Romero Bonifaz, quienes me consideraron para colaborar y llevar a cabo el muestreo en la expedición Antártida. Al Instituto Antártico Chileno (INACH) y al personal de la Estación Científica Profesor Julio Escudero por su apoyo logístico durante la expedición; de igual manera, al Instituto Antártico ecuatoriano (INAE) por permitirme participar de esta grandiosa experiencia. A mi cotutor, el Ph.D. Antonio Javier Vallecillo, y al tribunal de graduación, los doctores los doctores Omar Ruiz Barzola y Jonathan Coronel León, por su ayuda y retroalimentación durante mis estudios.

Un agradecimiento especial al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), a su director, Ph.D. Juan Manuel Cevallos, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme llevar a cabo la parte experimental de mi proyecto, y al personal que siempre estuvo dispuesto a colaborar. En particular, al MSc Rafael Viteri y a la Ing. Lizzete Serrano Mena por su inestimable ayuda en mi trabajo de investigación.

Finalmente, a todas las personas que estuvieron a mi lado durante todo este proceso. Sin sus palabras aliento constante, habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí. Estoy profundamente agradecido por su presencia en mi vida y su ayuda durante esta importante etapa en mi carrera.

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Jorge y Francia, mi mayor fuente de apoyo durante el comienzo de mi carrera profesional, brindándome su amor, guía y sabiduría, y así lograr alcanzar mis objetivos académicos y personales. A mis hermanos, sobrinos y amigos, y me han brindado su apoyo; en ellos he encontrado la fortaleza para seguir adelante.

Esta tesis es el resultado de varios años de trabajo arduo, por lo cual también quiero dedicar este trabajo a ese Jeffrey niño, cuyo amor y curiosidad por las ciencias comenzaron desde pequeño, y poderle decir que su sueño de ser explorador, investigador y científico se ha cumplido. Espero que este logro no solo llene de orgullo a mi familia y amigos, sino también les inspire a seguir sus sueños y metas.

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

Roberto Carlos Burbano, Ph.D.

**Presidente del tribunal**

Nardy Diez García, Ph.D.

**Tutor**

Antonio Javier Vallecillo Maza, Ph.D.

**Co-tutor**

Omar Honorio Ruiz Barzola, Ph.D.

**Evaluador**

Jonathan Ricardo Coronel Leon, Ph.D.

**Evaluador**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

---

Jeffrey David Vargas Perez

## RESUMEN

La búsqueda de nuevos antimicrobianos de amplio espectro se ha intensificado en la última década. La exploración de ambientes extremos como la Antártica puede resultar en la clave para la identificación de microorganismos capaces de producir bioproductos con gran interés biotecnológico. En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de microorganismos aislados en muestras de suelo en la Isla Rey Jorge en la Antártica.

A partir de 24 muestras de suelo recolectadas en 12 puntos en la Isla Rey Jorge, se lograron obtener 49 aislados a los cuales se evaluó la capacidad de producir antimicrobianos empleando el medio Caseína-Almidón para estimular la producción de estas moléculas. Se utilizó el espectro de inhibición del caldo fermentado contra patógenos certificados mediante la técnica de dilución en pocillo, y se determinó la viabilidad celular mediante el reactivo Allamar Blue y la actividad antimicrobiana se midió en unidades arbitrarias (UA/ml). Adicionalmente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de etil acetato.

Nueve cepas obtenidas a partir del universo de microorganismos presentaron la capacidad de inhibir al menos uno de los patógenos evaluados. Entre ellos, los aislados arbitrariamente nombrados K6, E7, y H4 identificados como *Streptomyces polyrhachis*, *Streptomyces fildesensis*, y *Streptomyces scabrisporus*, en base a su identidad de acuerdo con la región 16S rRNA. De estos aislados, mostraron actividad antimicrobiana en al menos uno de los patógenos evaluados. Es relevante destacar que el aislado K6 presentó la mayor capacidad de inhibición para *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* y *Staphylococcus aureus* con 320 y 160 UA/ml, respectivamente, mientras que su fracción de acetato de etilo tuvo un MIC de 250 y >500 ppm para las cepas evaluadas.

Los resultados de este trabajo demuestran el potencial del continente Antártico para obtener nuevos microorganismos que puedan ser empleados como agentes de biocontrol, lo que abre las puertas a la exploración de nuevas moléculas antimicrobianas con aplicabilidad en varias ramas de la biotecnología.

**Palabras claves:** Psicrófilos, *Streptomyces*, antimicrobiano, antifúngico, patógenos, fitopatígeno, banana

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO .....	II
DEDICATORIA .....	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN .....	IV
DECLARACIÓN EXPRESA .....	V
RESUMEN .....	VI
ÍNDICE GENERAL .....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
Simbología .....	XI
ÍNDICE DE IMÁGENES .....	XII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
CAPITULO 1.....	14
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	14
1.1    Antecedentes y Justificación.....	14
1.2    Objetivo general.....	15
1.3    Objetivos específicos .....	15
CAPITULO 2.....	16
MARCO TEORICO.....	16
2.1    El continente antártico y la bioprospección de microorganismos.....	16
2.2    Microorganismos antárticos .....	17
2.2.1    Actinobacterias.....	18
2.2.2    Capacidad antimicrobiana y antifúngica de los actinomicetos. ....	20
2.2.3    Control biológico y su rol en el suelo .....	21
2.3 <i>Fusarium oxysporum f.sp. cubense</i> y su impacto en el cultivo de banano.....	22
CAPITULO 3.....	24
METODOLOGÍA .....	24
3.1    Muestreo de los principales biomas terrestres de la Isla Rey Jorge en la Antártida	24
3.1.1    Zona de muestreo .....	24
3.1.2    Recolección de muestras de suelo Antártico.....	25
3.2    Aislamiento de microorganismos antárticos .....	26

3.2.1	Conteo de carga microbiana de las muestras de suelo .....	26
3.2.2	Aislamiento de microorganismos antárticos .....	27
3.2.3	Identificación molecular de los microorganismos antárticos aislados .....	27
3.3	Bioprospección de actividad antimicrobiana de microorganismos antárticos ....	28
3.3.1	Producción de antimicrobianos en medio líquido .....	28
3.3.2	Preparación de inóculos de cepas patogénicas .....	28
3.3.3	Pruebas de antagonismo por el método de difusión de pocillos en agar. ....	28
3.4	Análisis filogenético de los microorganismos productores.....	29
3.5	Caracterización de la actividad antimicrobiana de los aislados productores .....	29
3.5.1	Capacidad inhibitoria del medio de cultivo fermentado .....	29
3.5.2	Extracción de compuesto activo.....	30
3.6	Concentración mínima inhibitoria del extracto.....	30
3.7	Análisis estadístico.....	30
CAPITULO 4.....		31
RESULTADO Y DISCUSION.....		31
4.1	Aislamiento de microorganismos.....	31
4.1.1	Carga microbiana en muestras de suelo .....	31
4.1.2	Aislamiento e identificación de microorganismos antárticos .....	34
4.2	Diversidad de microorganismo antárticos aislados.....	35
4.3	Bioprospección de actividad antimicrobiana de microorganismos antárticos ....	39
4.3.1	Productores de antimicrobianos .....	39
4.3.2	Análisis filogenético e identificación molecular de los aislados productores	40
4.3.3	Capacidad de inhibición de caldo de cultivo fermentado .....	42
4.4	Concentración mínima inhibitoria.....	43
Conclusiones y recomendaciones .....		47
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		48

## ABREVIATURAS

AC	Análisis de correspondencia
ALB	Alamar Blue
ANOVA	Análisis de varianza
AP-3	Ansamitocina P-3
ASPA	Zona Antártica Especialmente protegida
BA	Zona Antártica Especialmente protegida
BE	Base Antártica Chilena Prof. Julio Escudero
BF	Bahía Fildes
BGM	Base Gran Muralla
BPJE	Base Profesor Julio Escudero
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELF	Elefantera
ETAC	Etil Acetato
FCn	Fluorescencia control negativo
FCp	Fluorescencia control positivo
FD	Factor de dilución
FEx	Fluorescencia medida del experimento
Foc	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>
Foc TR4	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> tropical raza 4
GC	Glacial Collins
GGBs	Grupos de genes biosintéticos
IA	Isla Ardley
IRJ	Isla Rey Jorge
LAC	Latino América y el Caribe
MCF	Medio de cultivo fermentado
MHA	Agar Mueller Hinton

MHB	Caldo Mueller Hinton
MRA	Microorganismos resistentes a antibióticos
MSA	Metabolitos secundarios de actinomicetos
N	Numero de colonias
NCBI	Centro Nacional de Biotecnología
OMS	Depsipéptido ohmyungsamycin
PBI	Producto interno bruto
PCA	Análisis de componentes principales
PCBs	Bifenilos policlorados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar dextrosa de papa
P/v	Peso / volumen
STA	Secretaría del Tratado Antártico
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Volumen de muestra

## SIMBOLOGÍA

°C:	Centígrado
µg	microgramo
µl	microlitro
cm	Centímetro
g	Gramo
g/l	Gramos sobre litro
h	Hora
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
Min	Minutos
ml	Mililitro
nm	Nanómetros
p/p	Peso sobre peso
p/v	Peso sobre volumen
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UA/ml	Unidades arbitrarias por mililitros
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1</b> Diversidad de ambientes Antárticos, sus microorganismos y compuestos bioactivos obtenidos (Correa and Abreu, 2020).....	17
<b>Imagen 2</b> Sistema de clasificación filogenética de Actinobacterias adoptadas por Manual de Bacteriología sistemática de Bergey (Lawson, 2018).....	20
<b>Imagen 3</b> Mecanismo que emplean los actinomicetos como agentes de biocontrol (Sharma and Salwan, 2018) .....	22
<b>Imagen 4</b> Muestras de suelo y las características biológicas de la zona de muestreo .....	25
<b>Imagen 5</b> Relación del pH y el conteo de microorganismos (UFC/ml) de las muestras de suelo entre los estratos A y B. ....	33
<b>Imagen 6</b> Análisis de componentes principales (PCA) del conteo de UFC, el número de aislados obtenidos y el pH de las 12 muestras evaluadas. ....	34
<b>Imagen 7</b> Distribución de los principales filos en las zonas evaluadas, la altura de cada barra indica el número de especies aislados en cada filo. ....	35
<b>Imagen 8</b> Biplot. Análisis de correspondencia (AC) entre los Filos de los microorganismos aislados y su distribución en las zonas de muestreo. ....	36
<b>Imagen 9.</b> Árbol filogenético de los aislado antárticos que presentaron actividad antimicrobiana. (A) Aislados K6, F3, y H4; (B) aislados H5, E7, E8, F6, K3, B7, A11, y C8. ....	41
<b>Imagen 10</b> Evaluación de la potencia actividad antimicrobiana del MCF expresada en Unidades Arbitrarias por mililitro (UA ml <sup>-1</sup> ) mediante el porcentaje de reducción de Alamar Blue. En esta prueba, el color rosado indica viabilidad celular (Control +), mientras que el color azul indica muerte celular (Control -). En la figura muestra el efecto en Foc y en la B en <i>S. aureus</i> .....	43
<b>Imagen 11</b> Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto ETAC, expresada en partes por millón (ppm), mediante el porcentaje de reducción de Alamar Blue. El color rosado indica la presencia de viabilidad celular (Control +), mientras que el color azul indica muerte celular (Control -). Los resultados se presentan para Foc en la figura A y para <i>S. Aureus</i> en la figura B. ....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Lista de principales antimicrobianos generados por actinomicetos y su actividad... 20	20
<b>Tabla 2</b> Coordenadas geográficas y codificación de las muestras de suelo colectadas..... 26	26
<b>Tabla 3</b> Conteo de UFC y valores de pH de las muestras de suelo analizadas, se muestra el valor P entre cada estrato mostrando las diferencias significativas entre los horizontes A y B. .... 31	31
<b>Tabla 5</b> Listado de microorganismos identificados y su número de accesoión a la base de datos del NCBI. .... 37	37
<b>Tabla 6.</b> Identificación molecular y actividad antimicrobiana de los aislados antárticos seleccionados ..... 40	40
<b>Tabla 7.</b> Actividad inhibitoria medida en Unidades arbitrarias (UA/ml) de los microorganismos seleccionados..... 42	42
<b>Tabla 8</b> Concentración mínima inhibitoria de los extractos purificados expresados en ppm ( <b>µg ml-1</b> ) ..... 45	45
<b>Tabla 9</b> Antimicrobianos reportados de los aislados antárticos obtenidos..... 46	46

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Antecedentes y Justificación

El uso indiscriminado y descontrolado de antimicrobianos en el sector agropecuario afectan gravemente a los microorganismos benéficos presentes en los ecosistemas del suelo y agua (Maarten van der Heijden et al., 2020; Rizzo and Giudice, 2020). Esto inhibe su crecimiento y reduce la secreción y acción de sus enzimas, que son importantes para la calidad del suelo y del agua (Cycoñ et al., 2019). Estudios han demostrado que los antimicrobianos liberados tienen un tiempo de vida promedio de 1 a 3466 días y su degradación está limitada por factores bióticos y abióticos del medio ambiente y por la naturaleza del antimicrobiano (Danilova et al., 2018). Esta continua exposición lleva a la selección de resistencia en microorganismos patógenos, convirtiendo estos ambientes en fuentes de microorganismos resistentes a antimicrobianos (MRA) para plantas, animales y seres humanos (Maarten van der Heijden et al., 2020), lo que afecta tanto a la salud pública como a la salud veterinaria, la producción agrícola, la economía y el desarrollo sostenible (Da Silva et al., 2020).

Junto con otras técnicas agropecuarias empleadas para mitigar la presencia de patógenos y la recirculación de nutrientes, el uso indiscriminado de antimicrobianos es responsables de la rápida propagación de genes responsables de la resistencia entre diferentes ambientes (Mann et al., 2021). Se estima que los MRA causarán anualmente 10 millones de muertes en los próximos 35 años y pérdidas anuales de 100 billones de dólares hasta el 2050 (WHO, 2016). Estudios demuestran que los patógenos son responsables del 10 y 15% de las pérdidas en los principales cultivos alrededor del mundo, de las cuales el 70 a 80% son causadas por hongos (Peng et al., 2021).

Ecuador, Costa Rica, Colombia y Guatemala son los mayores productores y exportadores de banano, café, cacao, atún y camarón a nivel de región (Ibarra-Velásquez et al., 2020). Para Ecuador, el sector agropecuario es el responsable del 9.28% del Producto Interno Bruto (PIB) (García Valarezo et al., 2019). Estos cultivos se ven constantemente afectados por plagas como *Mycosphaerella fijiensi*, *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, *Moniliophthora roreri* y *Mo. pernicioso* (Galarza et al., 2015), responsables del 50% de las pérdidas en cultivos agrícolas (FAO, 2019). Las pérdidas económicas se estiman en billones de dólares anuales, incluyendo la pérdida de volumen de producción, diagnóstico y costos de tratamiento (Zrnčić, 2020). Se prevé que para 2030, el consumo mundial de antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades asociadas a microorganismos resistentes aumente en un 67% (WHO, 2016). A finales de 2019, alrededor de 29 países de América, incluyendo Ecuador, se comprometieron a adoptar planes de acción con un enfoque multisectorial en sus políticas públicas para la contención de MRA (Da Silva et al., 2020).

El progreso económico en la nueva era de la biotecnología demanda nuevas biomoléculas con un amplio intervalo de aplicaciones, desde terapia médica hasta la manufactura industrial (Lamilla et al., 2017; Bruno et al., 2019; Santos et al., 2020). Por lo tanto, la búsqueda de

antimicrobianos biodegradables y amigables con el ambiente, como alternativas a los productos convencionales, es el principal objetivo de la industria agropecuaria (Sotomayor et al., 2019).

La Antártida alberga ambientes prístinos poco explorados, lo que hace que la bioprospección sea la principal alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos biológicos activos, como antimicrobianos, y sus microorganismos productores (Danilovich et al., 2018). Las condiciones extremas de frío favorecen modificaciones genéticas en los microorganismos, permitiéndoles sintetizar moléculas bioactivas con estructuras químicas que les permite realizar sus actividades biológicas a bajas temperaturas. Esto es una estrategia que permite que los microorganismos extremófilos, psicrófilos y psicrotolerantes proliferen en estos ambientes (Bratchkova and Ivanova, 2011; Zucconi et al., 2020). Algunas de estas moléculas poseen propiedades biológicas de interés y alto potencial biotecnológico (Santos et al., 2020). Varios estudios han demostrado que los géneros *Bacillus*, *Nocardia*, *Janthinobacterium*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Mycetocola*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudoarthrobacter*, *Rahnella*, *Siccibacter*, *Acremonium*, *Penicillium*, y *Pseudogymnoascus* son frecuentemente aislados de muestras de suelo antártico y presentan la capacidad de inhibir cepas de microorganismos patógenos (Lamilla et al., 2017; Onaka, 2017; Bruno et al., 2019; Marcolefes et al., 2019; Núñez-Montero et al., 2019a; Ogaki et al., 2020).

El presente trabajo se dirige a la búsqueda de microorganismos psicrófilos capaces de producir antimicrobianos, específicamente la búsqueda de microorganismos y sus metabolitos de secreción que tengan la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos y fitopatógenos. El aislamiento de microorganismos antárticos y su bioprospección permitirá obtener cepas con la capacidad de sintetizar compuestos antimicrobianos no identificados previamente, y determinar su potencial uso como alternativas a los antimicrobianos convencionales.

## 1.2 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de microorganismos bacterianos y fúngicos aislados de suelo de los alrededores de la base Prof. Julio Escudero de la Isla Rey Jorge en la Antártida, frente a agentes patógenos de interés agropecuario mediante la técnica de dilución en placa.

## 1.3 Objetivos específicos

- a. Identificar los aislados que presentan actividad antimicrobiana contra patógenos, mediante técnicas moleculares.
- b. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos de las cepas bacterianas y/o fúngicas seleccionadas, frente a patógenos agrarios mediante la técnica de dilución en placa.

## CAPITULO 2

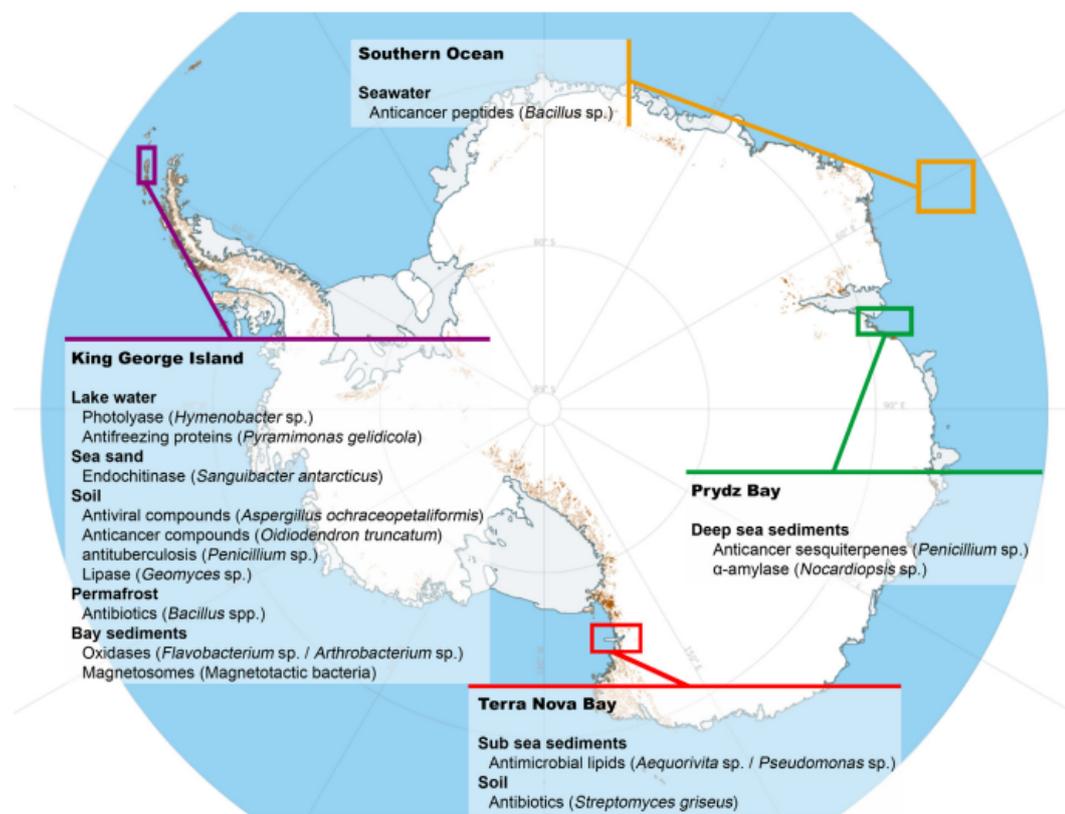
### MARCO TEORICO

#### 2.1 El continente antártico y la bioprospección de microorganismos

El continente Antártico es la reserva natural más grande del mundo, con un área aproximada de 14 200 000 Km<sup>2</sup>, la mayor parte de su territorio está cubierto por hielo, alrededor del 54 000 km<sup>2</sup> comprenden zonas costeras, montañosas y zonas marítimas libres de hielo donde se desarrolla la mayor actividad biológica en el continente (Brooks et al., 2019). Los suelos antárticos de estas zonas se han investigado en la última década debido a la diversidad de microorganismos presentes, tanto en su filogenia como en su funcionalidad (Ortiz et al., 2020). A pesar de las duras condiciones ambientales, los procesos biológicos han contribuido en su formación en la Antártida (pedogénesis), transformando áreas inhabitables en nuevos espacios para la colonización y desarrollo de organismos (Bölter et al., 1997).

La Isla Rey Jorge (IRJ) es la isla más grande del complejo archipiélago Shetland del Sur, con una longitud de 95 km y 25 km de ancho. El 90% de su superficie se encuentra cubierta por glaciares (Schories and Kohlberg, 2016). Presenta temperaturas medias anuales debajo de los 1°C en la zona costera, que descienden hacia el interior del continente. Esta isla se encuentran varias bases militares y científicas, incluida la Base Profesor Julio Escudero (BPJE), que brinda apoyo logístico y científico para investigaciones político, militar y científico en el archipiélago (Enrique Serrano Cañadas, 2001).

La bioprospección antártica es definida por la Secretaría del Tratado Antártico (STA) como la búsqueda de recursos bioquímicos y genéticos con alto valor comercial en plantas, animales y microorganismos antárticos (Hemmings et al., 2005). Las condiciones ambientales extremas han llevado a que estos organismos desarrollen características y capacidades únicas con alta aplicabilidad en la biotecnología e industria. La búsqueda de enzimas, antimicrobianos, biomoléculas con propiedad anticongelante, entre otros, es el principal motor que impulsa la investigación en el continente antártico, lo que ha llevado al descubrimiento de una gran variedad de microorganismos nativos capaces de producir compuestos con diversas actividades biológicas (Imagen 1) (Lamilla et al., 2017; Correa and Abreu, 2020).



**Imagen 1** Diversidad de ambientes Antárticos, sus microorganismos y compuestos bioactivos obtenidos (Correa and Abreu, 2020)

## 2.2 Microorganismos antárticos

En las últimas décadas, se han realizado amplios estudios sobre la microflora del suelo antártico y la heterogeneidad de las comunidades microbianas en diferentes zonas del continente. La biomasa microbiana en la antártica suele ser baja, siendo los hongos los mayores contribuyentes, aportando entre el 77 y el 99% del total (Malcheva et al., 2020). Los microorganismos en la Antártida muestran una extraordinaria diversidad, siendo las Acidobacteria, Actinobacteria, y Bacteroidetes las bacterias dominantes en el suelo (Cong et al., 2020), mientras que en los hongos se encuentran las clases Ascomycota, Zygomycota y Basidiomycota (Durán et al., 2019). Autores reportan que los Actinomicetos son raros de encontrar en el suelo antártico, mientras que en contraposición otros reportan que el 80% de aislados pertenecen a microorganismos de este género provenientes de muestras de suelos de valles desérticos (Lamilla et al., 2017).

El total de biomoléculas provenientes de microorganismos antárticos es incalculable, gracias a las adaptaciones únicas para sobrevivir en este ambiente extremo, lo que revela procesos biológicos novedosos. Entre las aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos se encuentra la degradación de contaminantes orgánicos como bifenilos policlorados (PCBs), e hidrocarburos, así como la producción de biosurfactantes y resistencia a la toxicidad por

metales pesados. Géneros como *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Sanguibacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Halomonas sp.* y *Psychroserpens* presentan estas propiedades biorremediadores (Lo et al., 2015).

Con respecto a enzimas activas a bajas temperatura, se ha reportado que grupos bacterianos como Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes Cyanobacteria, Proteobacteria, Deinococcus-Thermus, Planctomycetes, Verrucomicrobia, al igual que el grupo de las arqueas (Euryarchaeota), y eucariotas (Basidiomycota, Ascomycota, Cryptomycota y Rhizaria) son fuente de lipasas, proteasas, amilasas, B-galactosidasa, celulasa y enzimas modificadoras de lignina, que presentan la característica de ser funcionales a bajas temperaturas (Antony et al., 2016). En caso de los hongos, se han aislado géneros como *Papiliotrema*, *Phenoliferia*, *Rhodotorula*, *Tausonia*, *Vanrija*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Lecanicillium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pseudogymnoascus*, *Trichoderma*, y *Verticillium*, que poseen enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanasas, pectinasas, quitinasas, lipasas, proteasas, amilasas, oxidorreductasas como lacasas, catalasas y superóxido dismutasa (Duarte et al., 2018). Tantos microorganismos y sus enzimas desempeñan un papel importante en la bioquímica del suelo, especialmente en procesos relacionados con la degradación de la materia orgánica.

La mayoría de los suelos antárticos son considerados oligotróficos, es decir, suelos con niveles bajos de nutrientes y con disponibilidad reducida de nitrógeno orgánico (Ortiz et al., 2020). Esta escasez de nutrientes y otros factores ambientales, como cambios de pH, causa una competencia continua entre los microorganismos en el suelo, lo que conduce a la acción antagónica de cepas que ocupan el mismo nicho, restringiendo la colonización de otros organismos oportunistas (Lo et al., 2015).

En lo que se refiere a la producción de antimicrobianos, se ha encontrado que las clases *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* y *Cyanobacteria* son las que presentan la capacidad de producir estos compuestos en la Antártida (Rizzo and Giudice, 2020). La mayoría de estos antimicrobianos son más activos contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas. En el caso de los hongos antárticos, se han aislado géneros como *Geomyces sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* y *Antarctomyces psychrotrophicus* presentando actividad antimicrobiana contra bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, y el hongo *Candida albicans* (Abneuf et al., 2016).

### 2.2.1 Actinobacterias

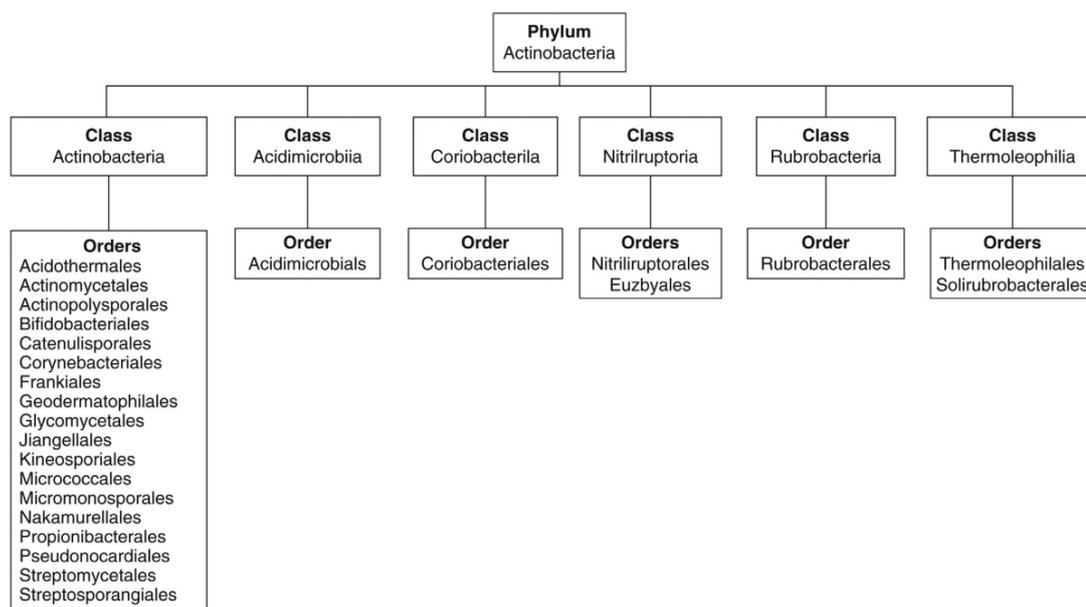
Los actinomicetos son un filo de bacterias aerobias Gram positivas que tienen características tanto de bacterias como de hongos, y son unos de los filos más grandes del dominio bacteria (Imagen 2). Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y en el océano, y pueden habitar en diversos ambientes con diferentes temperaturas, desde ambientes termófilos, hasta mesófilos y psicrófilos. Su distribución y actividad están influenciadas por factores como el pH, la salinidad y la relación entre carbono y nitrógeno en el medio, lo que afecta su crecimiento y la producción de antimicrobianos (Devanshi et al., 2021). El orden Actinomycetales se caracteriza por la formación de micelios vegetativos y aéreos (reproductivos), y presenta una

amplia gama de morfologías, capacidades fisiológicas y metabólicas, y características quimiotaconómicas (Lawson, 2018).

Los actinomicetos predominantemente en el suelo, el limo de cuerpos de agua y en la descomposición de materia vegetal, crecen en el suelo formando filamentos y son responsables del característico olor terroso de un suelo sano (Bhatti et al., 2017). Algunas especies de actinomicetos se encuentran como endófitos de plantas, como es el caso de *Neesia altissima*, y su interacción con la planta genera compuestos con nuevas estructuras químicas capaces de inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (Pratiwi et al., 2018).

Estos microorganismos son reconocidos por la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, antibióticas, antiprotozoarias, antivirales, anticolesterol, antihelmínticas, anticancerígenas e inmunosupresoras, convirtiéndolos en microorganismos económicamente y biotecnológicamente valiosos (Pratiwi et al., 2018). Encabezando la lista de organismos sintetizadores de productos farmacéuticos, nutracéuticos, antitumorales, enzimas, inhibidores enzimáticos y agentes quimioterapéuticos (Kontro et al., 2021). En la última década se ha potenciado el descubrimiento y desarrollo de metabolitos secundarios de actinomicetos (MSA), en conjunto con el estudio del genoma ha permitido identificar grupos de genes biosintéticos (GGBs) involucrados en la producción de estos metabolitos, se maximiza el potencial biotecnológico de los actinomicetos mediante la activación de genes que dan lugar a nuevas rutas metabólicas ocultas hasta la fecha. Se han aislado moléculas como el depsipéptido ohmyungsamycin (OMS) de un *Streptomyces* marino utilizado para el tratamiento de tuberculosis, la ansamitocina P-3 (AP-3), un anticancerígeno aislado de *Actinosynnema pretiosum* y *Streptomyces* aislados en las rizosferas de cultivos de leguminosas, que poseen una batería bioquímica capaz de otorgar nutrientes a partir de la materia orgánica del suelo. Se están realizando muchos otros estudios relacionados con los productos biotecnológicos provenientes de actinomicetos (Kim, 2021).

Los actinomicetos antárticos y aquellos aislados en ambientes extremos son los principales productores de moléculas con actividad antimicrobiana de amplio espectro, así como de otras biomoléculas con actividad fitotóxica, insecticida, anti-proliferativa y antitumoral. Estos microorganismos son un reservorio importante de nuevos genes que intervienen en rutas metabólicas para la producción de moléculas terapéuticas y biotecnológicas (Al-Ansari et al., 2020; Silva et al., 2020)



**Imagen 2** Sistema de clasificación filogenética de Actinobacterias adoptadas por Manual de Bacteriología sistemática de Bergey (Lawson, 2018).

### 2.2.2 Capacidad antimicrobiana y antifúngica de los actinomicetos.

Estudios previos han encontrado que actinomicetos como *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus* aislados en suelo antártico, presentaron actividad antifúngica frente a fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis sp.*, *Rhizoctonia solani*, y *Phytophthora infestans* (Santos et al., 2020). Los estreptomicetos son responsables de generar el 70% de los antibióticos descritos en comparación con otros géneros (Tabla 1), además de encontrar en ellos otras moléculas con nuevas propiedades biológicas (Al-Ansari et al., 2020).

Se ha documentado que el aislado antártico *Streptomyces flavovirens* presenta la capacidad de producir actinomicinas, antibióticos que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, esta molécula que presenta actividad antitumoral (Bratchkova and Ivanova, 2011). En estudios del genoma de *Streptomyces fildesensis* se determinó la presencia de genes involucrados en rutas metabólicas de la síntesis de actinomicina, lisopidín, marineosín e inhibidores proteasa/quinasa/fosfatasa RK-682 todas ellas con propiedades antimicrobianas y anticancerígenas (Núñez-Montero et al., 2019). Los actinomicetos contienen docenas de grupos de GGBs, que en su mayoría se encuentran silenciados. Se estima que solo el género *Streptomyces* es capaz de producir 150 000 metabolitos secundarios, pero solo el 5% de estos han podido ser caracterizados (Jackson et al., 2018). Especies de *Streptomyces* han demostrado ser efectivas como biocontroladores, presentando una fuerte actividad antagónica frente a fitopatógenos como el *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* tropical raza 4 (Foc TR4), reduciendo el crecimiento del micelio y la germinación de las esporas. *Streptomyces huiliensis sp. nov.* Demostró tener gran poder antifúngico frente a este patógeno (Qi et al., 2021).

**Tabla 1** Lista de principales antimicrobianos generados por actinomicetos y su actividad.

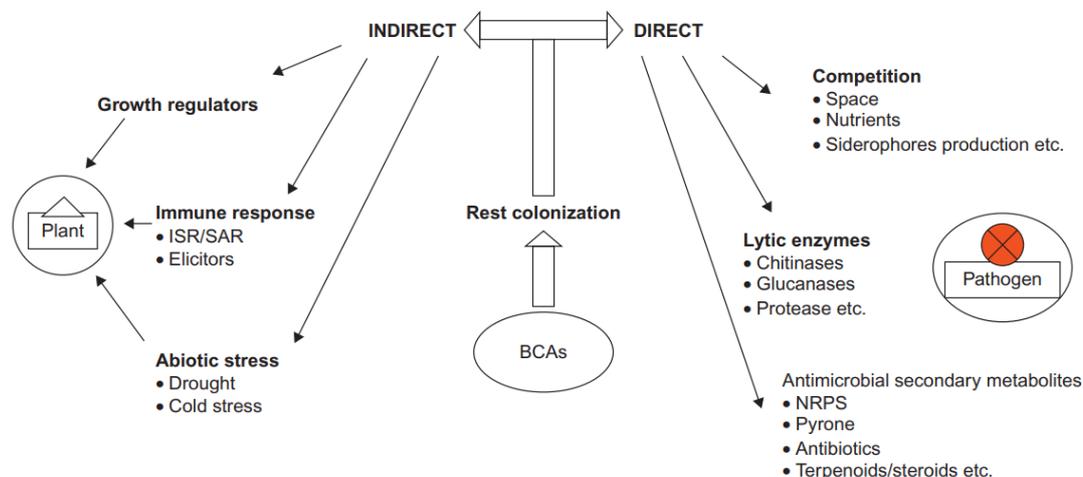
Antibiotic	Produced by	Activity
Lomofungin	<i>Streptomyces lomondensis</i>	Antifungal
Sclerothricin	<i>Streptomyces scleogranulatus</i>	Antifungal
Spoxamicin	<i>Streptosporangium oxazolinicum</i>	Antitrypanosomal
Avermectin	<i>S. avermitilis</i>	Antiparasitic
Antimycin	<i>Streptomyces lucitanus</i>	Antifungal
Rosamicin	<i>Micromonospora rosaria</i>	Antibacterial
Validamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antifungal
Azalomycin	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Antifungal
Roseoflavin	<i>Streptomyces davawensis</i>	Antibacterial
Rifamycin	<i>Micromonospora rifamycinica</i>	Antibacterial
Salinomycin	<i>Streptomyces albus</i>	Antiparasite

### 2.2.3 Control biológico y su rol en el suelo

La población de Actinomycetos se concentra en su mayoría en la superficie del suelo y se va reduciendo en los estratos más profundos de la capa de suelo (Bhatti et al., 2017). Como saprofitos, reciclan la materia orgánica presente en el suelo y se extienden a lo largo de los estratos del suelo mediante a capacidad de formación de hifas. Participan activamente en las primeras etapas de descomposición, siendo los actinomicetos termófilos los que proliferan debido al aumento de temperatura en este proceso. La diversidad de actinomicetos en suelo se encuentra influenciada por la diversidad de plantas, ya que los metabolitos que secretan pueden estimular o suprimir la proliferación de actinomicetos en el suelo y la rizosfera (Devanshi et al., 2021).

Con respecto a la abundancia en suelo, el género *Streptomyces* es el más frecuentemente aislados en el suelo. Pueden encontrarse desde suelos desérticos hasta suelos de bosque húmedo, pero el mejor habitat para el aislamiento de estos microorganismos es la rizosfera. Allí aprovechan los recursos que las plantas le otorgan, como mecanismos de defensa, y secretan metabolitos capaces de inhibir a organismos oportunistas, como es el caso de la *Cyperus rotundus*, que afecta a los cultivos de arroz donde *Streptomyces sp.*, *Streptoverticillium sp.*, *Actinomadura sp.*, *Kitasatosporia sp.*, *Nocardiosis sp.*, *Pseudonocardia sp.*, y *Kibdelosporangium sp.* presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de esta hierba (Anandan et al., 2016).

*Streptomyces* y *Micromonospora* utilizan la celulosa, hemicelulosa, ligninas y proteínas como fuentes de carbono y nitrógeno, pero tienen poca capacidad para reducir nitratos (Devanshi et al., 2021). Dentro de la cadena trófica, por su crecimiento lento, los actinomicetos son los últimos en atacar la materia orgánica depositada siendo degradada inicialmente por hongos y bacterias. Sin embargo, posee la maquinaria enzimática necesaria para descomponer la materia orgánica recalcitrante, liberando al medio pigmentos que otorgan el color característico al suelo. Intervienen en el suelo produciendo ácidos orgánicos, como el ácido málico, y como fijadoras de nitrógeno mediante relaciones simbióticas con plantas (Bhatti et al., 2017). Los mecanismos de biocontrol de actinomicetos (Imagen 3), involucran la activación de la respuesta inmune de la planta he incrementa el crecimiento de las plántulas y la longitud de la raíz en cuanto a la supresión de los fitopatógenos, se les atribuye la combinación de enzimas hidrolíticas y compuestos antimicrobianos, que incluyen compuestos volátiles como la isopreno, acetona, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-3-buten-1-ol, 3-methyl-1-butanol, dimetil disulfide, dimetil trisulfide, 2-feniletanol, y geosmina (Sharma and Salwan, 2018).



**Imagen 3** Mecanismo que emplean los actinomicetos como agentes de biocontrol (Sharma and Salwan, 2018)

*Streptomyces huiliensis*, aislado de la rizosfera de *Opuntia stricta*, presento actividad antifúngica frente a Foc TR4, y su extracto de acetato de etilo (ACE) alcanzo una concentración mínima inhibitoria 6.25 ug/ml. El efecto del extracto en las esporas y micelios de Foc TR4 causo una irregularidad en la célula y una reducción de la pared celular, además, se observó ruptura en el núcleo, vacuola y mitocondria se presentó una ruptura de estas. Llevando a una baja producción de micelios por parte del hongo (Qi et al., 2021). Un comportamiento similar se observó en *Streptomyces* sp. aislado de coral marino, cuyo caldo de fermentación aplicado en plántulas de banana inoculadas con Foc TR4 aumentó la resistencia al hongo e inhibió su desarrollo normal (Wang et al., 2022). La aplicación del caldo también actúa como promotor de crecimiento, aumentando en el contenido de clorofila, diámetro del tallo, área de la hoja, altura de la planta, y grosor de la hoja (Li et al., 2021).

### 2.3 *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* y su impacto en el cultivo de banano

*Fusarium* es un fitopatógeno que ataca a varios cultivos alrededor del mundo, entre los cuales el cultivo de Banano es el más afectado por este hongo. Entre las 4 razas principales (Foc 1- Foc 4), la raza 4 es la más agresiva, ya que puede infectar a casi todos los cultivares de banana, son las causantes de las principales pérdidas en el sector bananero después de *Mycosphaerella fijiensis* (Ploetz, 2015). Originario del sureste de Asia, en los últimos años ha llegado a varias áreas, incluyendo las Islas Canarias, Sudáfrica y Australia. En 2019, una infección afecto aproximadamente 175 ha en Colombia (García-Bastidas et al., 2019) y en el 2021 se reportó un brote de Foc TR4 en Perú (FAO, 2022). *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc) causo la pérdida de cultivares “Gros Michel”, que fue el principal producto de exportación del Centro y Sur América (Magdama et al., 2020).

La exportación mundial de banano disminuyo de 21.5 millones de toneladas en 2020 a 20 millones en 2021. En Latino América y el Caribe (LAC), las exportaciones disminuyeron un 2% en el 2021, lo que representa 400 000 toneladas menos que en el 2020. Ecuador, el mayor exportador de la región, registro una reducción del 4%, aproximadamente 6.8 millones de

toneladas, debido a los costos adicionales sobre mitigación y contención de brotes de Foc TR4 presentado en Colombia y Perú (FAO, 2022). Uno de los principales problemas para erradicar este patógeno es la falta de controles químicos, ya que este hongo ha desarrollado resistencia a la mayoría de los fungicidas comerciales. El manejo y la contención de la enfermedad también son tareas complicadas, ya que se ha descubierto que las clamidosporas pueden sobrevivir hasta 20 años en el suelo (Ploetz, 2015).

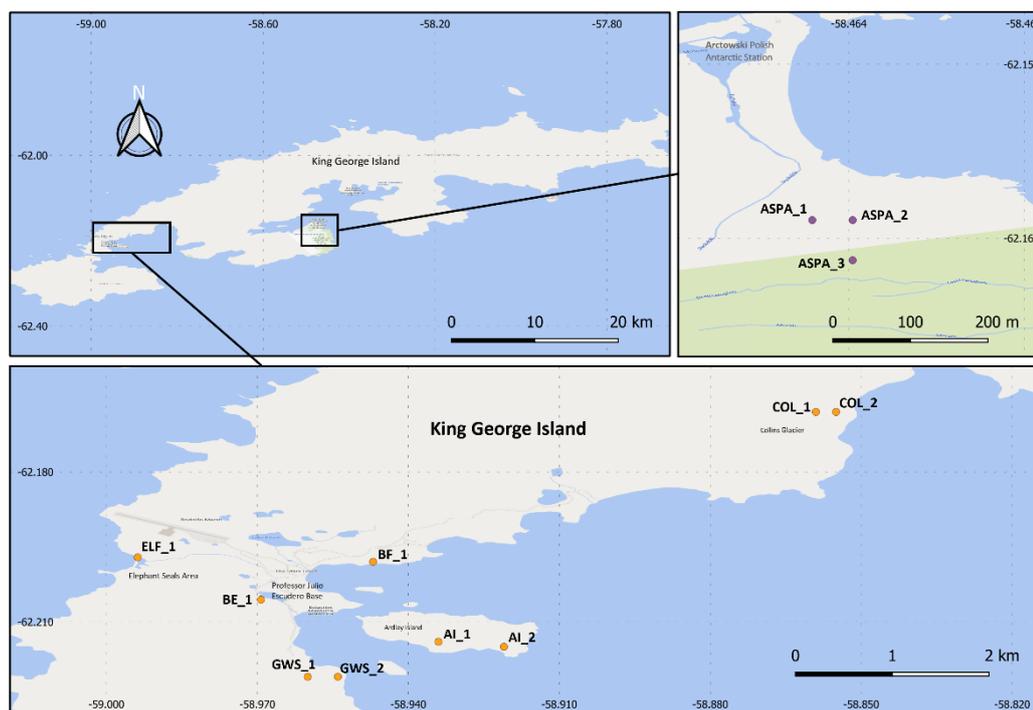
## CAPITULO 3

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Muestreo de los principales biomas terrestres de la Isla Rey Jorge en la Antártida

##### 3.1.1 Zona de muestreo

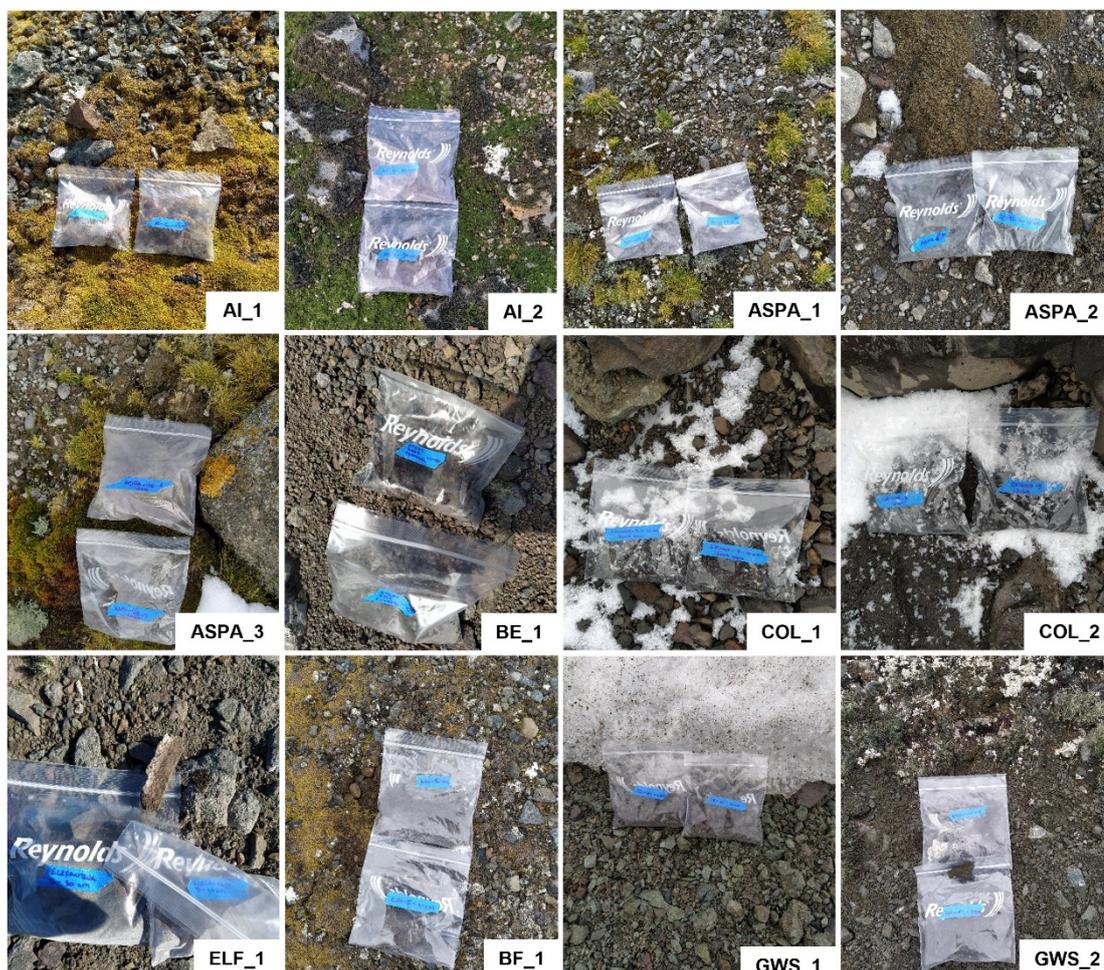
El muestreo fue realizado en el marco de la expedición Antártica chilena No° 56 y la expedición No° 24 ecuatoriana durante el verano antártico del 2020. Las zonas de muestreo fueron seleccionadas según las características bióticas, representadas por los componentes vivos en el suelo como son la presencia de materia vegetal, plantas y la biomasa presente en sus raíces (Almela et al., 2021), y abióticas como temperatura, humedad y pH (Teramoto et al., 2022) presentes en los biomas terrestres dentro de la Isla Rey Jorge. Las muestras colectadas pertenecieron a zonas ubicadas frente a la Bahía Fildes (BF), Glacial Collins (GC), Base Gran Muralla (BGM), Isla Ardley (IA), la Elefantera (ELF), los alrededores de la Base Antártica Chilena Prof. Julio Escudero (BE) y dentro de la Zona Antártica Especialmente protegida número 128 (ASPA\_128) ubicada cerca de la Base Henryk Arctowski (BA) (**Mapa I**).



**Mapa I** Puntos de muestreo dentro de la isla Rey Jorge, Antártida.

Las muestras colectadas abarcan los principales biomas terrestres antárticos que engloban zonas costeras, montañas, deshielo de glaciares y lagunas, que presentan una mayor actividad

biológica como son los asentamientos de mamíferos marinos, anidamiento de aves, presencia de materia orgánica, musgo y líquenes (Imagen 4).



**Imagen 4** Muestras de suelo y las características biológicas de la zona de muestreo

### 3.1.2 Recolección de muestras de suelo Antártico

Se seleccionaron 12 zonas para este estudio dentro de la IRJ. Las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo se registraron con el sistema de posicionamiento global Garmin GPSMAP 62S y se codificaron con un sistema de letras y números para organizar la información de material colectado (Tabla 2). Los puntos de colección se graficaron en el mapa con ayuda del Sistema de Información Geográfica Quantum GIS 3.16.0 (Mapa I). Se midieron parámetros como la temperatura del suelo con un termómetro digital (VWR® Traceable®) y el pH de suelo (Thermo Scientific™ Orion™ 3-Star Benchtop pH Meter) siguiendo el protocolo descrito por (Mylavarapu et al., 2020). Se colectaron 50 g de suelo por muestreo aleatorio simple de los primeros 10 cm de Superficie (A) y a una profundidad de 30 cm (B)

utilizando una pala metálica, se depositaron en bolsas de plástico estériles con cierre hermético. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su transporte y procesamiento.

**Tabla 2** Coordenadas geográficas y codificación de las muestras de suelo colectadas

Zona	Muestra	Coordenadas geográficas	
		Latitud (S)	Longitud (W)
Isla Ardley	AI_1	62° 12' 50.4'	58° 56' 2.399"
	AI_2	62° 12' 54"	58° 55' 15.599"
Base Profesor Julio Escudero	BE_1	62° 12' 21,42"	58° 58' 9,516"
Glaciar Collins	COL_1	62° 10' 4.8"	58° 51' 32.4"
	COL_2	62° 10' 4.8"	58° 51' 17.999"
Elefantera	ELF_1	62° 11' 51,54"	58° 59' 36,7440"
Bahia Fildes	BF_1	62° 11' 52.8"	58° 56' 49.2"
Base Gran Muralla	GWS_1	62° 13' 15.6"	58° 57' 36"
	GWS_2	62° 13' 15.6"	58° 57' 14.4"
Base Henryk Arctowski (ASPA_128)	ASPA_1	62° 9' 50.4"	58° 27' 50.399"
	ASPA_2	62° 9' 46.8'	58° 27' 54"
	ASPA_3	62° 9' 46,8"	58° 27' 50.399"

## 3.2 Aislamiento de microorganismos antárticos

### 3.2.1 Conteo de carga microbiana de las muestras de suelo

Se pesaron 2 g de suelo de cada muestra manteniendo las condiciones de frío. Se colocó la muestra en un tubo de 50 ml y se agregó una solución estéril de NaCl 0.9% (p/v) hasta completar un volumen final de 10 ml. Cada muestra se homogenizó durante 30 segundos usando un agitador vortex marca Labnet VX100. Se prepararon diluciones seriadas en una relación 1:10 del sobrenadante. Se sembraron 100  $\mu$ l de las diluciones  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$  por duplicado y se dispersaron sobre placas con ayuda de un asa de Drigalski sobre con medio nutritivo diluido en una relación 1:10 [0.8 g/l de BD DIFCO™ Nutrient Broth, 10 g/l BD BACTO™ Agar (Pulschen et al., 2017)]. Las placas se incubaron a una temperatura de 15°C en la incubadora marca Thermo Scientific Precision en ausencia de luz durante 15 días

(Danilovich et al., 2018). Pasado el periodo de incubación, se contabilizó el número de unidades formadoras de colonia (UFC ml<sup>-1</sup>) de cada dilución y su respectiva réplica, aplicando la siguiente formula.

$$UFC\ ml^{-1} = \frac{N \times FD}{V\ (ml)}$$

N= Número de colonia contabilizada en la placa

FD= Factor de dilución de la muestra.

V= Volumen de muestra sembrada en ml

### 3.2.2 Aislamiento de microorganismos antárticos

Con ayuda de un palillo de madera estéril se seleccionaron colonias de acuerdo con la forma y color de la colonia, y se sembraron sobre Agar Nutritivo marca BD Difco™, incubando bajo las condiciones mencionadas en el apartado 3.2.1. Los aislados obtenidos fueron agrupados de acuerdo a las características macroscópicas textura, forma y color de la colonia (Parada et al., 2017). Con ayuda de la aplicación para dispositivo móvil Color Grab V3.9.2 de LOOMATIX ([www.loomatix.com](http://www.loomatix.com)) se determinó el color de las colonias en escala RAL (Reichsausschuß für Lieferbedingungen und Gütesicherung). Para la clasificación microscópica se utilizó tinción de Gram y observación bajo el Microscopio marca ZEISS Axio Scope.A1, de acuerdo con su morfología se categorizaron preliminarmente como bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, previo a su identificación molecular.

### 3.2.3 Identificación molecular de los microorganismos antárticos aislados

Las cepas que presentaron actividad antagónica se incubaran en medio MHB de 5 a 7 días a 15°C y fueron centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 10°C. El ADN genómico se extrajo mediante el protocolo propuesto por Ausubel (2002), y fue almacenado a -20°C. El gen 16S RNA fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores universales 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5'CGGTTACCTTGTACGACTT 3'). El Mix de PCR estará compuesto por 1 µL de ADN molde (20 ng/µL), 12.5 µL de GoTaq® Master Mix (Promega Corporation), 1 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, y 9.5 µL de agua ultra pura. Las condiciones de la PCR comprenderán una desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos dedesnaturalización a 96°C por un minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto, y elongación a 72°C por 1 minuto. Se complementa con una final extensión a 72°C para 3 minutos. Los productos de PCR serán analizados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% (P/v). El producto de PCR será purificado y secuenciados en Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). BLASTn será usado para comparar los datos de secuencias contrastando con la base de datos de las secuencias de nucleótidos (NCBI's). La edición y alineado de las secuencias se realizaron empleando el software libre FlinchTV versión 1.5.0 y MEGA 11.0, las secuencias se almacenaron en la base de datos de The National Center for Biotechnology (NCBI).

### **3.3 Bioprospección de actividad antimicrobiana de microorganismos antárticos**

#### **3.3.1 Producción de antimicrobianos en medio líquido**

Los aislados previamente seleccionados se incubaron en caldo “Caseína – Almidón” [3 g/l almidón soluble, 3 g/l de glucosa, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de tripona, 1.2 g/l de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), 1.2 g/l de fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0.03 g/l de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 0.012 g/l de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), 0.005 g/l de sulfato de hierro II (FeSO<sub>4</sub>)] para estimular la producción de antimicrobianos (Al-Ansari et al., 2020). Se colocaron 30 ml del medio de cultivo en frascos de vidrio con un volumen nominal de 50 ml. Para la preparación del inóculo, se tomó una colonia con ayuda de un asa de platino y se suspendió en solución estéril de cloruro de sodio al 0.9%, la cual se llevó a una concentración de 0.5 en escala Macfarland (1.5x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) con ayuda de un densitómetro (Densimat from Biomérieux Biotechnology). La inoculación en el medio de cultivo fue en una relación del 10% (v/v). Para los hongos filamentosos, se utilizaron bloques de agar de 6 mm de diámetro que contenía el hongo y se colocaron directamente al medio de cultivo. Los frascos se incubaron durante 15 días a una temperatura de 15°C y a una velocidad de 120 rpm en la incubadora refrigerada New Brunswick™ Innova® 44 Series. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el caldo de cultivo se centrifugo a una velocidad de 120 rpm, a 4°C durante 10 minutos en la centrifuga refrigerada Thermo Scientific ST16R, se recuperó el medio de cultivo fermentado (MCF) y se almacena a 4°C hasta su posterior uso.

#### **3.3.2 Preparación de inóculos de cepas patogénicas**

Los microorganismos que se emplearan en el ensayo de antagonismo fueron cultivados en agar nutritivo (NA) para el caso de *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Erwinia sp.*, *Ralstonia sp.*, *Straphilococcus aeurus*, *Escherichia coli (TOP10F')*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium (ATCC14028)* se incuban a una temperatura de 28°C (Heraeus Thermo B15 Compact Mini Inkubator Incubator Brutschrank 50°C 15 L) durante 24 horas.

Para el caso de *Fusarium oxysporum* se cultivaron en agar dextrosa de papa (PDA) marca BD DIFCO™ a una temperatura de 28 °C durante 7 días. La obtención de esporas se logró siguiendo el protocolo propuesto por (Al-Hatmi et al., 2017) con las siguientes modificaciones. Se agregan de 2 a 3 ml de una solución de Tween 20 al 0.005% sobre la superficie de la placa colonizada por el hongo, con un asa de Drigalski se esparce la solución hasta que el micelio quede completamente impregnado con la solución. Se realiza un barrido con una ligera presión sobre la superficie del micelio y se colecta la solución de esporas en el extremo de la caja Petri. Se colocó la muestra en microtubos estéril de 2 ml y se dejaron reposar 10 minutos para que se precipiten fragmentos de micelio grande. Se colectó la fase superior y se traspasó a un tubo nuevo. Para cada aislado se preparó una solución a una concentración de 0.5 en la escala McFarland siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.3.1 y se contabilizó el número de esporas de Foc con ayuda de la cámara de Neubauer.

#### **3.3.3 Pruebas de antagonismo por el método de difusión de pocillos en agar.**

Los ensayos de antagonismo se realizaron en agar Mueller Hinton (MHA - Sigma-Aldrich). Se colocaron 100 µl de cada inóculo preparado en el punto 1.3.2 sobre placas con agar Mueller Hinton por duplicado. Con ayuda de un asa Drigalski se distribuyó uniformemente el inóculo

en la superficie del agar y se dejó secar con la tapa abierta dentro de la cámara de flujo alrededor de 10 min. Luego se utilizó un sacabocado estéril para hacer pocillos en las placas previamente inoculadas y se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los extractos obtenidos de los microorganismos antárticos en el punto 1.3.1. Las placas se incubaron a 28°C; para las bacterias, las placas se revisaron entre las 24 y 48 horas, mientras que, para hongos, se revisaron entre los 5 a 7 días. La presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos indica un resultado positivo para la acción antimicrobiana (Danilovich et al., 2018).

### 3.4 Análisis filogenético de los microorganismos productores

El análisis filogenético será generado con el software MEGA 11 (Tamura et al., 2021) usando la especie de referencia estrechamente relacionadas, donde se incluyen la secuencia de *Atinokineospora xionganensis* y *Micrococcus lylae* como grupo externo.

### 3.5 Caracterización de la actividad antimicrobiana de los aislados productores

#### 3.5.1 Capacidad inhibitoria del medio de cultivo fermentado

La capacidad inhibitoria del extracto será expresada en Unidades Arbitraria por mililitro (UA  $\text{ml}^{-1}$ ), este valor indica la máxima dilución del extracto que presenta actividad inhibitoria. Esta técnica frecuentemente se emplea para determinar la potencia de inhibición del MCF cuya composición o concentración del principio activo es desconocido (Hussein et al., 2021). El MCF se diluyó a razón de 1:2, la cual se obtuvieron diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64. Para calcular las UA  $\text{ml}^{-1}$  se utilizó la siguiente fórmula (Parada et al., 2017).

$$\text{UA ml}^{-1} = FD \frac{1 \text{ ml}}{V_e}$$

FD = Factor de dilución del medio de cultivo fermentado (MCF) que presento actividad inhibitoria.

$V_e$  = Volumen del MCF sembrado en ml (0.1 ml).

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos marca Corning™ Costar™, y los MCF se diluyeron en caldo Mueller-Hinton (MHB - Sigma-Aldrich). Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en cada pocillo, con su respectivo duplicado. Para los hongos se inoculó 10  $\mu\text{l}$  de una solución de esporas  $1 \times 10^4$  células/ml, y para bacterias, se inoculó  $5 \times 10^5$  UFC. Las placas se sellaron con Parafilm para evitar la deshidratación de la muestra y se incubaron a 28°C durante 24 horas para bacterias y 72 horas para hongos. Después del periodo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el reactivo Alamar Blue (ALB - Sigma-Aldrich); se colocaron 10  $\mu\text{l}$  ALB en cada pocillo y se incubaron durante 4 horas. La resazurina presente en el ALB se reduce a resorufina en las células vivas, lo que causa un cambio de coloración del azul al rosa fluorescente (Monteiro et al., 2012). Las placas se leyeron es un espectrofotómetro marca The Synergy™ HT – BioTek con una excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente. Se utilizó medio de cultivo (MHB) sin inoculación como control negativo, y medio de cultivo MHB con inoculación como control positivo, para obtener una reducción completa del reactivo resazurina. El porcentaje de reducción del ALB se obtuvo aplicando la siguiente formula:

$$\% \text{ Reducción de alamarBlue} = \frac{(F_{Exp} - F_{Cn})}{(F_{Cr} - F_{Cn})} \times 100$$

**FEx**= Fluorescencia medida del experimento

**FCn**= Fluorescencia del control negativo

**FCp**= Fluorescencia del control positivo

### **3.5.2 Extracción de compuesto activo**

Se centrifugo el MCF de los microorganismos a una velocidad de 6000 rpm a 10°C durante 30 minutos para retirar las células suspendidas. Luego, se mezcló el sobrenadante en una proporción 1:1 con acetato de etilo (ETAC) y se mantuvo en continua agitación. Posteriormente, se separó la capa de ETAC con ayuda de un embudo de decantación y se concentró el extracto con ayuda de un rotavaporador a 40°C. Para eliminar el contenido residual, se incubó el extracto con una centrifuga al vacío se incubó a 45°C durante una hora. Finalmente, se presó el extracto y se almaceno a 4°C (Abneuf et al., 2016; Shanthi Kumari et al., 2020)

### **3.6 Concentración mínima inhibitoria del extracto**

El extracto crudo se diluyo en Dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener la solución madre. Las concentraciones utilizadas fueron 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.2 partes por millón (ppm) (Rodríguez-Melcón et al., 2022). Se aseguro que la concentración final de DMSO en cada pocillo fuera del 6% para prevenir la precipitación del extracto. El ensayo se efectuó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.4.1.

### **3.7 Análisis estadístico**

Los datos de conteo microbiano se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) entre los estratos (A y B) para cada muestra, las diferencias fueron consideradas como significativas con valores P menores o igual a 0.05. Los valores son dados en promedios con su respectiva desviación estándar ( $\pm$ ). Para los análisis de componentes principales (CPA) y de correspondencia (AC) entre los variables a analizar y la generación de gráficos, se empleó el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2011).

## CAPITULO 4

### RESULTADO Y DISCUSION

#### 4.1 Aislamiento de microorganismos

##### 4.1.1 Carga microbiana en muestras de suelo

De las 24 muestras de suelo analizadas, la mayor carga microbiana se obtuvo de la Base Henryk Arctowski (ASPA\_128), Isla Ardley, Glacial Collins y la Base Prof. Julio Escudero. Los valores de UFC se detallan en la Tabla 3. Con respecto a la carga microbiana presente en los estratos evaluado, las muestras con mayores conteos de UFC se encuentran en ASPA\_3\_A, AI\_2\_A, y Col\_1\_A, pertenecientes al horizonte A (primeros 10 cm de superficie), con valores de  $6E+06$ ,  $4E+06$ , y  $2E+05$  UFC ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que para el horizonte B (30 cm de suelo), las muestras ASPA\_3\_B, ASPA\_1\_B, y BE\_1\_B presentaron valores de  $2E+05$ ,  $1E+05$ , y  $4E+04$  UFC ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

La abundancia de microorganismos se encuentra estrechamente relacionado con el porcentaje de carbono y nitrógeno en suelo. En la Isla Rey Jorge, se reportan valores promedio de C entre 0.10 a 2.65% y de N de 0.01 a 0.36%, siendo el Glacial Collins el que presenta los valores más altos (Durán et al., 2019). El mayor conteo de UFC es este trabajo se presentó en la muestra perteneciente al área antártica especialmente protegida (ASPA) ubicada en los alrededores en la base Arctowski, la cual reporta valores de C 2.60% y N 0.48% en suelo. Esta zona se caracteriza por presentar sitios de asentamiento y anidamiento de aves marinas (pingüinos y skuas), lo que contribuyen a un aporte de nutrientes, permitiendo la proliferación de microorganismos en el suelo. Aunque se reportan conteos de UFC entre  $10^8$  y  $10^9$ , estos valores van a ser variables dependiendo del lugar y la estación climática del muestreo.

Las muestras pertenecientes al Isla Ardley y Glacial Collins presentaron las mayores diferencias significativas en sus conteos de UFC, con valores altos en los primeros 10 cm de suelo, reduciéndose considerablemente a 30 cm de profundidad. Las diferencias entre los estratos de las muestras AI\_1 ( $p=0.006$ ), COL\_1 ( $p=0.007$ ), y COL\_2 ( $p=0.005$ ), se asocian a la estructura del suelo en la zona de la que se recolectó la muestra, formada por una capa de musgo o materia orgánica en la superficie, sobre una cama de grava.

**Tabla 3** Conteo de UFC y valores de pH de las muestras de suelo analizadas, se muestra el valor P entre cada estrato mostrando las diferencias significativas entre los horizontes A y B.

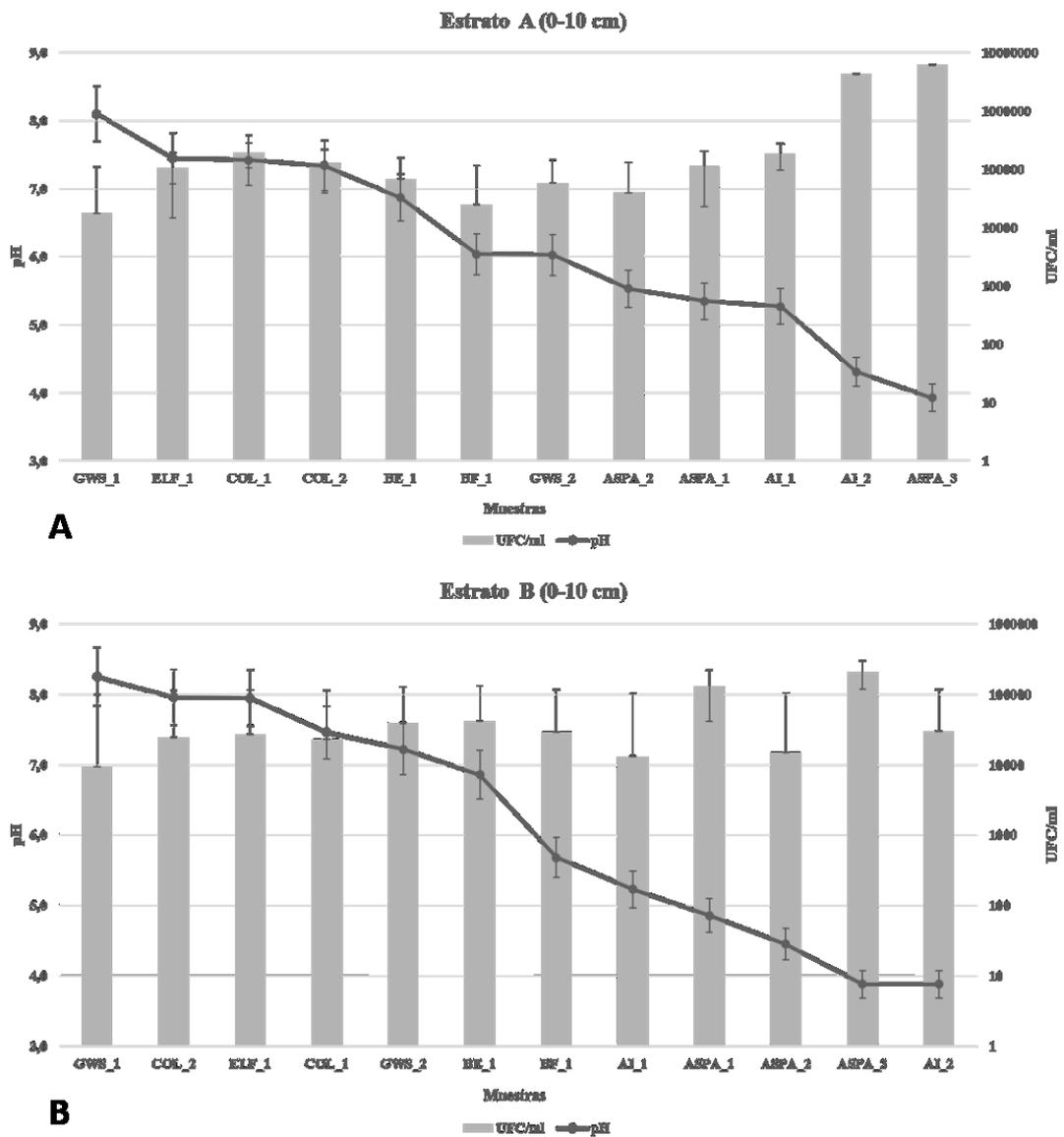
Zona	Muestra	Unidades formadoras de colonia (UFC/ml)		p-value	pH	p-value
Isla Ardley	AI_1_A	1,86E+05	± 1,91E+04	0,006*	5,27 ± 0,01	0,03*
	AI_1_B	1,30E+04	± 4,24E+03		5,23 ± 0,01	
	AI_2_A	4,28E+06	± 7,35E+05	0,015*	4,31 ± 0,02	0,006*
	AI_2_B	3,00E+04	± 9,90E+03		3,88 ± 0,04	

Base Polaca Henryk Arctowski(ASPA_128)	ASPA_1_A	1,13E+05	±	1,70E+04	0,335	5,35 ± 0,13	0,032*
	ASPA_1_B	1,32E+05	±	1,20E+04		4,86 ± 0,01	
	ASPA_2_A	3,95E+04	±	9,19E+03	0,045*	5,53 ± 0,04	0,001*
	ASPA_2_B	1,50E+04	±	1,41E+03		4,45 ± 0,01	
	ASPA_3_A	6,17E+06	±	1,25E+06	0,021*	3,93 ± 0,01	0,293
	ASPA_3_B	2,08E+05	±	1,70E+04		3,88 ± 0,05	
Professor Julio Escudero Base	BE_1_A	6,75E+04	±	9,19E+03	0,061	6,87 ± 0,01	0,892
	BE_1_B	4,20E+04	±	1,41E+03		6,86 ± 0,09	
Isla Collins	COL_1_A	1,95E+05	±	1,98E+04	0,007*	7,42 ± 0,01	0,089
	COL_1_B	2,30E+04	±	1,41E+03		7,46 ± 0,01	
	COL_2_A	1,30E+05	±	7,78E+03	0,005*	7,34 ± 0,04	0,003*
	COL_2_B	2,40E+04	±	7,07E+03		7,95 ± 0,02	
Elefantera	ELF_1_A	1,05E+05	±	1,63E+04	0,027*	7,45 ± 0,11	0,026*
	ELF_1_B	2,70E+04	±	8,49E+03		7,95 ± 0,02	
Isla Rey Jorge (Base Gran Muralla)	GWS_1_A	1,75E+04	±	1,06E+04	0,214	8,10 ± 0,02	0,019*
	GWS_1_B	9,50E+03	±	7,07E+02		8,25 ± 0,02	
	GWS_2_A	5,85E+04	±	3,54E+03	0,026*	6,03 ± 0,02	0,001*
	GWS_2_B	3,90E+04	±	2,83E+03		7,22 ± 0,01	
Isla Rey Jorge (Bahía Fildes)	BF_2_A	2,45E+04	±	3,54E+03	0,399	6,04 ± 0,06	0,019*
	BF_2_B	2,90E+04	±	0,00E+00		5,68 ± 0,04	

La abundancia de microorganismos en suelo está directamente influenciada por diversos parámetros del suelo, como son el pH, química del suelo, tamaño de grano, humedad del suelo, además de los microclimas presentes en los diferentes hábitats, y la crioturbación, que es la mezcla de materiales de los diferentes horizontes del suelo a causa de la congelación y descongelación (Krauze et al., 2021). Tanto la Isla Ardley y como el Glacial Collins se encuentran rodeados de glaciales. Durante el deshielo constante en el verano antártico, en los horizontes más profundos del suelo, se produce un continuo escurrimiento del agua del deshielo, lo que ocasiona un lavado continuo de nutrientes. Esto se traduce en un contenido más bajo en la relación C/N y en materia orgánica. A su vez, provoca una menor proliferación de microorganismos en los estratos más profundos (Bölter et al., 1997). La composición y abundancia de la microfauna del suelo antártico se encuentra correlacionada principalmente con la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , fósforo, y con la salinidad (Velasco-Castrillón et al., 2014).

Los rangos de pH del suelo se encuentran entre 3.88 y 8.25 (Tabla 3), lo cual está dentro del intervalo reportados en trabajos previos (Bölter et al., 1997; Michel et al., 2014; Alekseev and Abakumov, 2018). Estos valores son ligeramente más ácidos y alcalinos que los reportados en trabajos realizados en la IRJ en 2017, donde se registraron valores de 5.46 a 7.23 (Durán et al., 2019). Los suelos con mayor concentración de aislados presentan valores de pH de suelo en el intervalo de 3.9 a 6.0 (Imagen 5). Estos valores ácidos están relacionados con la actividad

ornitogénica y suelos orgánicos debido a la presencia de amonio y ácidos orgánicos (Bockheim, 2014). En contraste, los valores más alcalinos se presentaron en los suelos alrededores de la Estación Gran Muralla, Elefantera, y el glaciar Collins, debido a su origen alcalino, derretimiento de glaciares y la reducida presencia de materia orgánica.

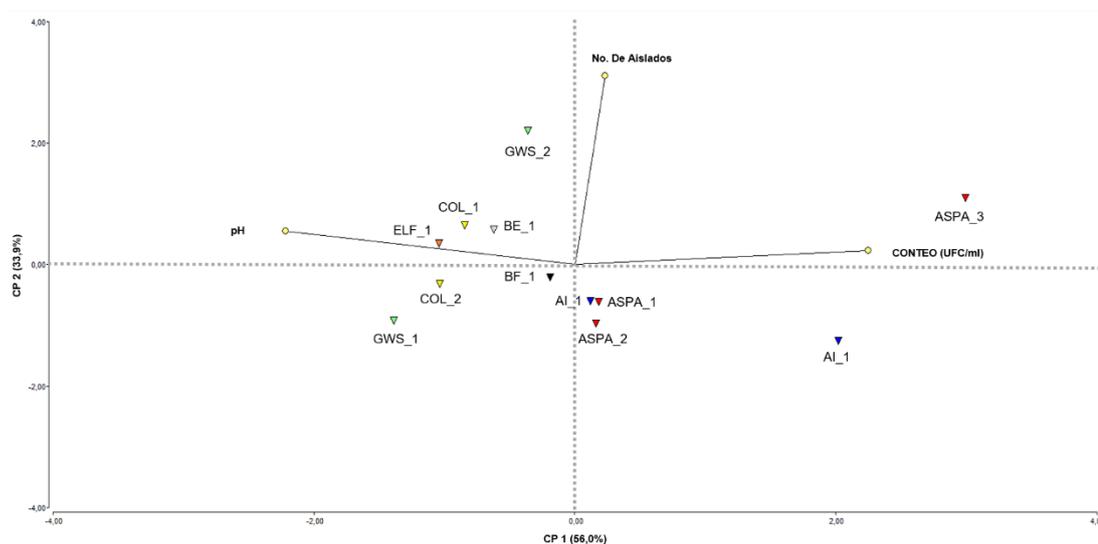


**Imagen 5** Relación del pH y el conteo de microorganismos (UFC/ml) de las muestras de suelo entre los estratos A y B.

Las muestras AI\_2 y ASPA\_3 que presentaron los mayores conteos de UFC y los valores de pH más ácidos. Como se muestra en la Imagen 5, no se evidencia una relación entre el conteo de microorganismos y el pH en las muestras evaluadas. El coeficiente de correlación de Pearson entre estas variables fue negativo (-0.44), lo que indica que no existe correlación entre ellas.

Sin embargo, sí hubo relación (0.74) con el número de aislados cultivable obtenidos en las muestras (Imagen 6).

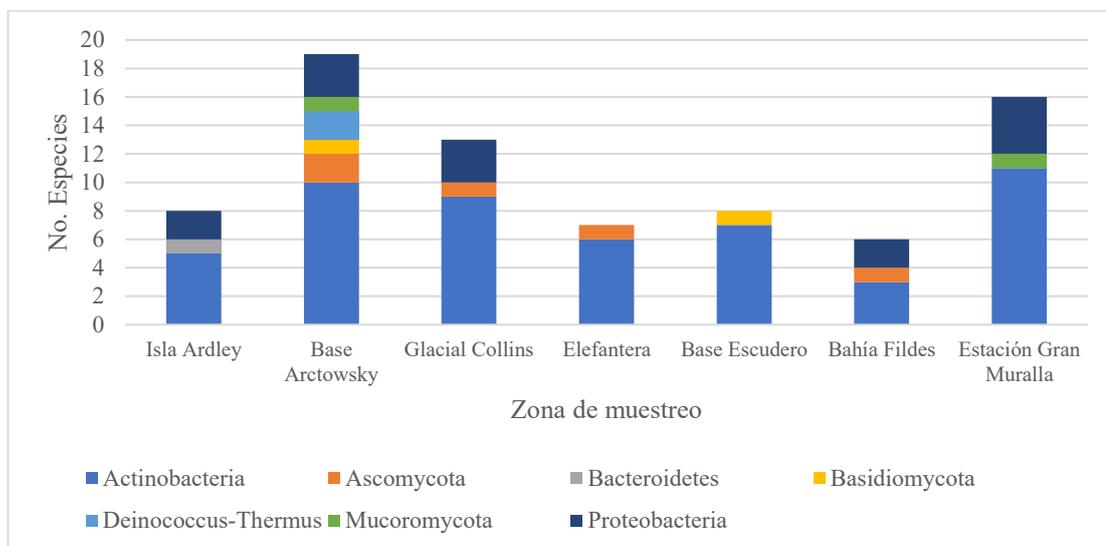
A nivel continental, el pH del suelo ejerce una fuerte influencia en la comunidad bacteriana, guardando una estrechamente relacionada a la abundancia y la riqueza de microorganismos, siendo menor en suelos ácidos en comparación a suelos metros y básicos. Sin embargo, en el continente antártico este comportamiento es diferente. Se ha determinado que el aumento en la abundancia de microorganismos está influenciada por la salinidad más que por la humedad y el pH (George et al., 2021). Aunque el pH no altera directamente la diversidad del suelo y no tiene influencia en la diversidad alpha y beta, si es un indicador de la calidad de los suelos y puede predecir la abundancia de filos como Actinobacterias, Acidobacterias, y Bacteroides (Lauber et al., 2009). Se presume que el comportamiento del pH en suelos antárticos, en comparación con suelos agrícolas o boscosos, se debe a las condiciones ambientales a las que están sometidos anualmente. Estas condiciones incluyen desecación, baja temperaturas (-15 a -40°C) durante el invierno y amplias fluctuaciones de temperatura (35-65°C) durante el verano antártico (Cowan et al., 2014).



**Imagen 6** Análisis de componentes principales (PCA) del conteo de UFC, el número de aislados obtenidos y el pH de las 12 muestras evaluadas.

#### 4.1.2 Aislamiento e identificación de microorganismos antárticos

Con la ayuda de la caracterización macroscópica y microscópica, se obtuvieron 77 aislados de un universo de 162 cultivables, de los que, tras la identificación molecular, se obtuvieron 49 especies. Las muestras BGM\_2 y ASPA\_3 provenientes de la Estación Gran Muralla y Base Arctowski, obtuvieron el mayor número de aislados con 9 para ambas muestras. A pesar de que BGM\_2 presento un conteo bajo de UFC en comparación con ASPA\_3, logro obtener un mayor número de especies (Imagen 6). La muestra AI\_2, originaria de la Isla Ardley, a pesar de presentar el segundo mayor conteo de UFC, solo se aislaron 3 especies (Imagen 6).

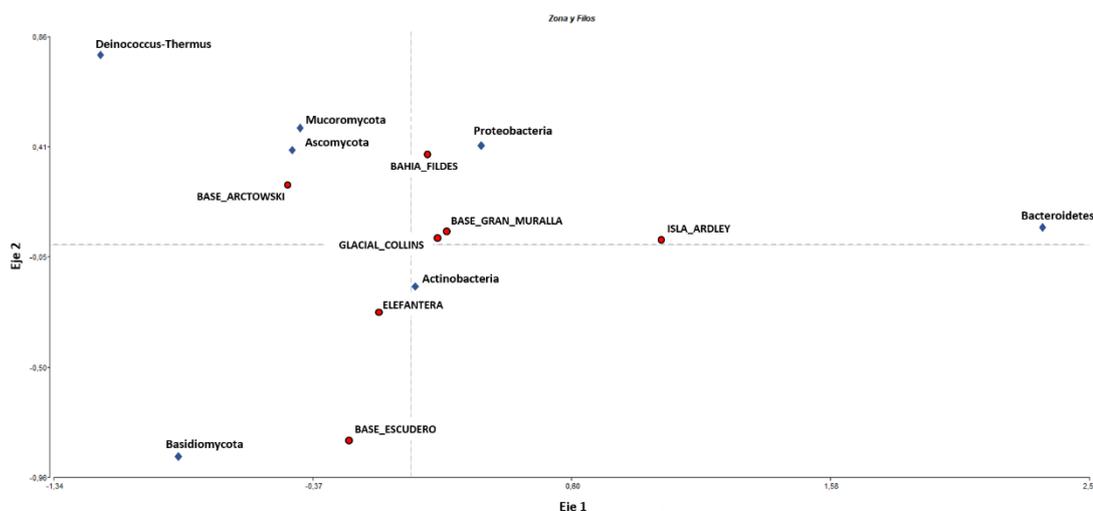


**Imagen 7** Distribución de los principales filos en las zonas evaluadas, la altura de cada barra indica el número de especies aislados en cada filo.

En estas zonas se observó la presencia de musgos y líquenes. Estudios previos en la IRJ indica que la presencia de plantas y musgo está ligada a la abundancia de microorganismos y que el conteo de estos se encuentra directamente relacionada al contenido de materia orgánica (Bölter et al., 1997). Al igual se reporta que en la isla, el aumento de diversidad bacteriana en suelo y agua se atribuye a la actividad humana, aumentando las interacciones entre las comunidades locales de microorganismos, contribuyendo a la aparición de moléculas bioactivas con potencial biotecnológico (Rizzo and Giudice, 2020).

#### 4.2 Diversidad de microorganismo antárticos aislados

Los 49 aislados antárticos corresponde a los siguientes filos: Actinobacterias (53,06%), Proteobacterias (24,49%), Ascomycota (8,16%), Basidiomycota (4,08%), Deinococcus-Thermus (4,08%), Mucoromycota (4,08%), y Bacteroidetes (2,04%). Estos filos se encontraron distribuidos entre las Zonas de muestreo dentro de la IRJ como se muestra en la Imagen 8. Los individuos de estos filos aislados en la Antártida, reportan la capacidad de producir diversas moléculas de gran interés biotecnológico, como antimicrobianos, antitumorales, insecticidas, herbicidas, estimuladores de crecimiento en plantas, fitohormonas, ácidos grasos entre otras (Gomes et al., 2018; Dahal et al., 2020; Yurkov et al., 2020; Zhang et al., 2020; Benaud et al., 2021; Tistechok et al., 2021).



**Imagen 8** Biplot. Análisis de correspondencia (AC) entre los Filos de los microorganismos aislados y su distribución en las zonas de muestreo.

Los filos de Actinomicetos y Proteobacterias son los que presentaron una mayor presencia entre los microorganismos identificados, ubicándose la mayoría de ellos en la Base Arktowsy, Gran Muralla y Glacial Collins, que representan el 58.82% y el 71.43% del total de aislados, respectivamente. Estudios realizados en los suelos de la IRJ revelan una alta abundancia de estos filos, los cuales se desarrollan especialmente en áreas donde los glaciales se han derretido recientemente, llevando a cabo procesos fototrópicos, fotoheterotróficos y quimiolitotróficos (Krauze et al., 2021).

Como se visualiza en la Imagen 8, las dos primeras dimensiones del análisis de correspondencia (AC) de las variables evaluadas (No. de especies y filos), con un porcentaje de inercia del 61.88%, se observa un agrupamiento de las zonas de muestreo alrededor de los Actinomicetos, lo que estaría indicando que estas zonas comparten similitudes con respecto a la composición de este filo bacteriano. Por otro lado, las Proteobacterias se agrupan alrededor de este filo zonas como la Bahía Fildes, Base Gran Muralla, Glacial Collins, e Isla Ardley.

Con respecto a las zonas, la Base Arctowski se logró aislar 6 de los 7 filos identificados, lo cual se refleja en el Eje 1 (ver Imagen 8). Esta zona se ubica en el primer cuadrante superior del biplot, donde se agrupan los filos de Ascomycota, Mucoromycota, y Deinococcus-Thermus. Por otro lado, zonas como Base Escudero se observa un distanciamiento en la agrupación de los filos, siendo estas las que presentaron la menor diversidad de microorganismos aislados, y no se logró aislar Actinomycetos en sus muestras.

En la Imagen 4, se puede observar las presencias de plantas vasculares, musgos y líquenes en las zonas de muestreo. Estas plantas desempeñan un papel fundamental en la producción primaria, la fijación de nitrógeno, y la formación de suelo al atrapar polvo con sus raíces y tallos, lo que contribuye a la abundancia de microorganismos en el suelo (Benavent-González et al., 2018). En la IRJ se encuentran las dos únicas angiospermas de la Antártida *Deschampsia antarctica* Desv. y *Colobanthus quitensis*. Además, esta isla presenta la mayor diversidad de

líquenes, representando el 77% de la diversidad de toda la Antártida (So et al., 2023). El conjunto de este material vegetal forma lo que se conoce como “islas” o “parches” de fertilidad dentro de los ecosistemas áridos. Estos lugares son atractivos para las aves marinas habiten, a su vez que aportan altos contenidos de carbono y nitrógeno a través de las deposiciones, dando origen a los suelos ornitogénicos (Ortiz et al., 2020). La zona ASPA\_128, ubicada en los alrededores de la Base Arctowski, se caracteriza por tener la mayor concentración de pingüinos de papúa (*Pygoscelis papua*) de la IRJ. Los suelos ornitogénicos activos, en formación, se caracterizan por ser abundantes en Firmicutes, mientras que en los suelos de actividad ontogénica pasada se encuentran Bacteroides y Proteobacterias, y en suelos minerales, libres de actividad ontogénica, destacan las Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacterias (Kim et al., 2012). En relación a la presencia de musgos y líquenes, se reporta que la rizosfera de estos organismos está mayormente poblada por Actinobacterias (86%), y en menor proporción por Acidimicrobiales y Solirubrobacteria. Solo en la rizosfera de *Deschampsia antarctica*, los Actinomycetos son el filo más abundante con un 34%, seguido de *Chloroflexi* (21%) y Proteobacteria (20%) (Silva et al., 2020). En este estudio, las *Pseudomonas* representaron solo el 24.49% del total de aislados, en comparación con los valores reportados de los aislados cultivables obtenidos en la IRJ, donde *Pseudomonas* y *Flavobacteria* constituyeron 41% y el 23% del total (González-Rocha et al., 2017).

De los 7 filos se identificaron 33 géneros, de estos géneros *Agreia*, *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Glaciihabitans*, *Humibacillus*, *Leifsonia*, *Microbunus*, *Nakamurella*, *Nocardia*, *Phycococcus*, *Pseudarthrobacter*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Streptacidiphilus* y *Streptomyces* coinciden con los géneros y especies reportados en la Tabla 4, los cuales han sido frecuentemente aislados en suelos antárticos y han demostrado la capacidad de producir antimicrobianos capaces de inhibir la proliferación de cepas patogénicas (Bruno et al., 2019; Marcoletas et al., 2019; Núñez-Montero et al., 2019; Ogaki, Coelho, et al., 2020; Ogaki, Teixeira, et al., 2020; Onaka, 2017; Rizzo & Giudice, 2020). Las especies aisladas que se detallan en la Tabla 4, han sido previamente identificadas en muestras de suelo y agua provenientes de la Antártida, según se ha mencionado por Yu et al., (2011), Lamilla et al. (2017), y Núñez-Montero and Barrientos (2018).

Estos resultados sugieren que la distribución de los filos dentro de la IRJ está influenciada por factores bióticos y abióticos característicos para cada zona. Esto permite comprender la ecología microbiana, la dinámica de la comunidad microbiana de la zona y su relación con el ambiente circundante.

**Tabla 4** Listado de microorganismos identificados y su número de accesión a la base de datos del NCBI.

Nombre científico	% de Identidad	No. de accesión
<i>Agreia sp. Ens29</i>	99.20%	DQ339625.1
<i>Arthrobacter livingstonensis</i>	100.00%	MW928758.1

<i>Arthrobacter sp.</i>	98.12%	KY405915.1
<i>Arthrobacter sp.</i>	99.64%	KY476561.1
<i>Arthrobacter sp.</i>	99.25%	MN810185.1
<i>Arthrobacter terrae</i>	99.00%	MN334158.1
<i>Caballeronia sordidicola</i>	99.86%	GQ181055.1
<i>Chryseobacterium balustinum</i>	97.84%	MT081086.1
<i>Cryobacterium arcticum</i>	99.71%	MN513229.1
<i>Cryobacterium psychrotolerans</i>	99.78%	MH482228.1
<i>Deinococcus psychrotolerans</i>	98.47%	CP034183.1
<i>Deinococcus rubellus</i>	99.71%	KX036988.2
<i>Embleya scabrispora</i>	99.13%	EU841700.1
<i>Glaciihabitans tibetensis</i>	99.34%	MF555712.1
<i>Humibacillus sp.</i>	98.63%	MN368728.1
<i>Massilia violaceinigra</i>	99.40%	CP063361.1
<i>Nakamurella sp.</i>	98.48%	KY117519.1
<i>Nocardia ninae</i>	99.78%	MH241036.1
<i>Noviherbaspirillum psychrotolerans</i>	98.27%	OP080954.1
<i>Phycococcus sp.</i>	99.49%	KX990229.1
<i>Polaromonas glacialis</i>	99.07%	MF555703.1
<i>Polaromonas glacialis</i>	99.88%	MZ311828.1
<i>Polymorphobacter glacialis</i>	98.82%	OP080935.1
<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i>	99.50%	OP080992.1
<i>Pseudarthrobacter scleromae</i>	99.42%	HQ202866.1
<i>Pseudarthrobacter scleromae</i>	99.64%	MW960219.1
<i>Pseudarthrobacter scleromae</i>	99.57%	MW960220.1
<i>Pseudarthrobacter sp.</i>	98.92%	MN315459.1
<i>Pseudarthrobacter sp.</i>	98.69%	MN384878.1
<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	99.56%	MW960232.1
<i>Pseudomonas mandelii</i>	99.86%	MH587026.1
<i>Pseudomonas silesiensis</i>	99.87%	NR_156815.1

<i>Pseudoxanthomonas gei</i>	99.06%	NR_134145.1
<i>Rhizobium sp. 9.4.1</i>	99.63%	HQ324668.1
<i>Rhodococcus psychrotolerans</i>	99.35%	NR_164891.1
<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	95.86%	NR_043009.1
<i>Salinibacterium xinjiangense</i>	98.49%	MN559418.1
<i>Sphingomonas aerolata</i>	99.56%	MW507646.1
<i>Sphingomonas sp. AAP5</i>	99.33%	CP037913.1
<i>Sphingomonas sp. PDD-60b-34</i>	98.67%	KR922205.1
<i>Streptacidiphilus carbonis</i>	99.85%	MW507713.1
<i>Streptomyces avidinii</i>	100.00%	KJ531617.1
<i>Streptomyces cirratus</i>	99.78%	MT083993.1
<i>Streptomyces fildesensis</i>	100.00%	MK742730.1
<i>Streptomyces fildesensis</i>	100.00%	MT052583.1
<i>Streptomyces fildesensis</i>	99.10%	NR_115761.1
<i>Streptomyces libani</i>	99.22%	NR_115779.1
<i>Streptomyces polyrhachis</i>	96.91%	NR_125651.1
<i>Streptomyces sp.</i>	99.85%	OP094004.1
<i>Streptomyces sp. MI-3.3 YI</i>	99.71%	FN550118.1
<i>Streptomyces spororaveus</i>	99.78%	EU570465.1
<i>Streptomycetaceae bacterium</i>	100.00%	MT386193.1
<i>Variovorax paradoxus</i>	99.50%	MK371073.1

---

### 4.3 Bioprospección de actividad antimicrobiana de microorganismos antárticos

#### 4.3.1 Productores de antimicrobianos

Se evaluó la capacidad de producción de antimicrobianos de los 49 aislados seleccionados. En el primer muestreo, alrededor de 21 aislados presentaron actividad inhibitoria contra al menos uno de los patógenos evaluados. Sin embargo, al reevaluar los aislados después de la tercera subcultivación, el número de organismos inhibidores se redujo a 11 (Tabla 5). Esta pérdida de la capacidad de inhibición fue reportada por Danilovich et al., (2018), donde el número de microorganismos con actividad se redujo de 63 a 27 aislados. Esta reducción se asocia con factores como la variación de la concentración y calidad de nutrientes en los medios de cultivo. Aunque la glucosa e hidratos de carbono son la fuente principal para la producción de biomoléculas activas, se ha reportado que también pueden actuar como interferentes en la

síntesis de antibióticos. La producción de biomoléculas estará limitada a la fuente de carbono preferida por el microorganismo productor (Sánchez et al., 2010). En el caso de *Streptomyces*, la producción de antimicrobianos está limitada a cambios de pH, siendo óptima la producción en un rango de 10 (Zhu et al., 2014). En la Tabla 5 se indica la lista de los microorganismos que presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (ATCC25923) y *F. oxysporum* (EC-15-E-GMI).

**Tabla 5.** Identificación molecular y actividad antimicrobiana de los aislados antárticos seleccionados

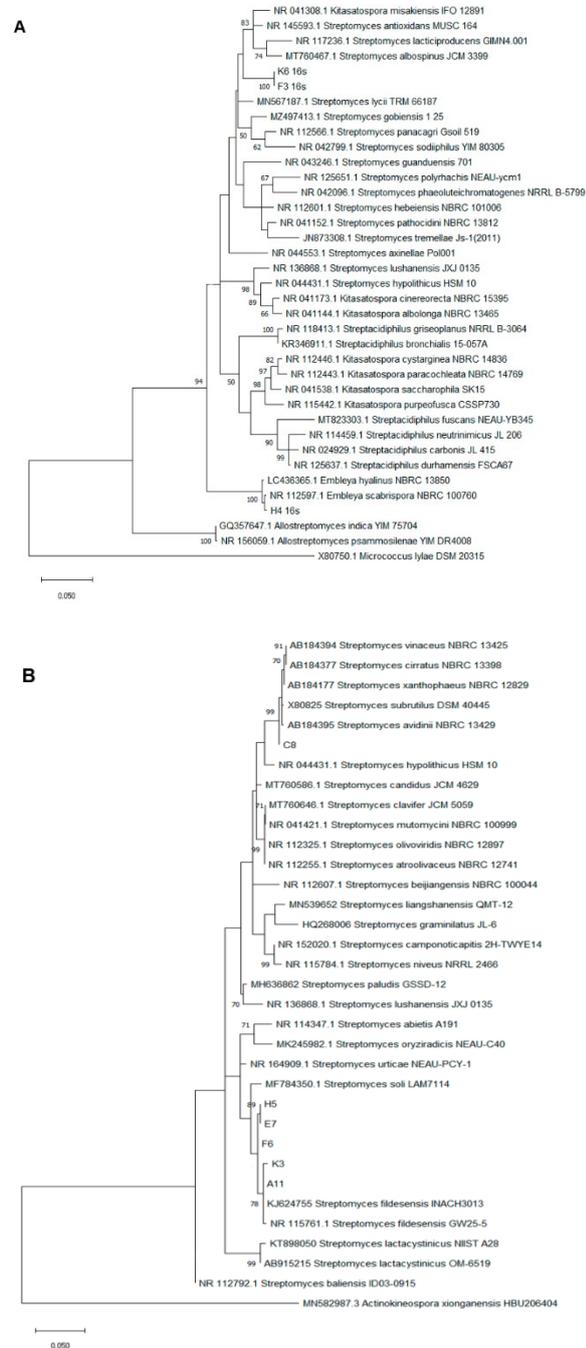
Zona	Taxón más cercano (16SrARN)	Aislado	% de Identidad	Actividad antimicrobiana	
				<i>S. aureus</i>	<i>F. oxysporum</i>
	<i>Streptomyces fildesensis</i>	E8	98,7	+	-
Bahía Fildes	<i>Streptomyces fildesensis</i>	B7	100	+	+
	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	H4	99,13	-	+
Base Artowsky	<i>Streptomyces fildesensis</i>	H5	99,11	-	+
	<i>Streptomyces fildesensis</i>	E7	99,4	+	+
Base Escudero	<i>Streptomyces fildesensis</i>	A11	100	-	+
	<i>Streptomyces fildesensis</i>	F6	100	-	+
	<i>Streptomyces sp.</i>	K3	99,85	-	+
Estación Gran Muralla	<i>Streptomyces polyrhachis</i>	F3	96,91	+	+
	<i>Streptomyces polyrhachis</i>	K6	96,98	+	+
Glacial Collins	<i>Streptomyces nojiriensis</i>	C8	99,91	-	+

(+): Se observó inhibición del patógeno evaluado; (-): No se observó inhibición del patógeno evaluado

#### 4.3.2 Análisis filogenético e identificación molecular de los aislados productores

Las secuencias parcialmente completas del gen 16S rRNA de las cepas seleccionadas H5, E7, E8, F6, K3, A11, B7, y C8, se alinearon con aquellas de otras cepas que parecían tener secuencias de genes 16S rRNA altamente similares de la base de datos NCBI. Las cepas E8, B7, H5, E7, A11, F6 y K3 mostraron el porcentaje más alto de similitudes de secuencia del gen 16S rRNA con *Streptomyces fildesensis* (98.41, 99.56, 98.85, 99.11, 99.71, 99.63 y 99.20%, respectivamente); F3 y K6 mostraron una similitud del 97.04 y 96.98% a *S. polyrhachis* (Imagen 9, B); C8 tiene una similitud del 99.57% a *S. xanthophaeus*; y H4 a *Embleya hialina* con 98.48% (Tabla 5). El análisis filogenético mostró que las cepas K3, A11 y B7 estaban estrechamente relacionadas con *S. fildesensis*, formando un clado distinto (Imagen 9, B), mientras que H5, E7 y E8 formaron un clado separado de *S. fildesensis*, al igual que la cepa F6. Por otro lado, la cepa H4 se agrupó con *Embleya spp.* Pero se observó que K6 y F3 están filogenéticamente distantes de las otras cepas de *Streptomyces* utilizadas en este análisis

(Imagen 9,A). Para aclarar las relaciones entre las cepas seleccionadas, es necesario secuenciar y analizar otros genes (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB*).



**Imagen 9.** Árbol filogenético de los aislados antárticos que presentaron actividad antimicrobiana. (A) Aislados K6, F3, y H4; (B) aislados H5, E7, E8, F6, K3, B7, A11, y C8.

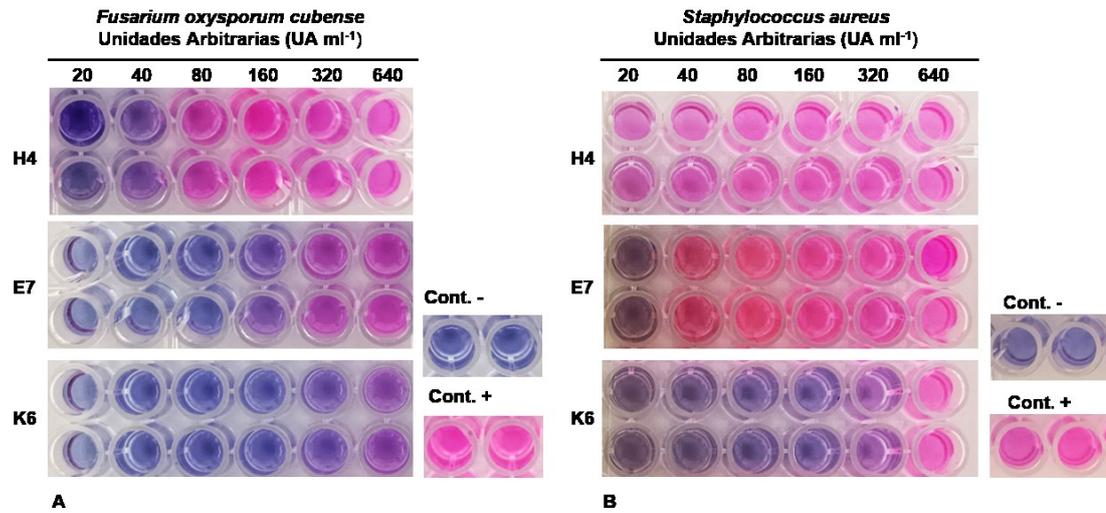
### 4.3.3 Capacidad de inhibición de caldo de cultivo fermentado

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los caldos fermentados (Imagen 10), se encontró que los aislados K6, E7 y H4 identificados como *Streptomyces sp.*, *Streptomyces fildesensis* y *Streptomyces scabrisporus*, respectivamente, presentaron actividad inhibitoria contra los patógenos evaluados. La Tabla 6 resume el número de unidades arbitrarias (UA) obtenidas de los aislados seleccionados.

**Tabla 6.** Actividad inhibitoria medida en Unidades arbitrarias (UA/ml) de los microorganismos seleccionados.

Taxon más cercano (16SrARN)	Aislado	UA/ml	
		<i>S. aeurus</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Embleya scabrispora</i>	H4	-	40
<i>Streptomyces fildesensis</i>	E7	20	80
<i>Streptomyces polyrhachis</i>	K6	160	320

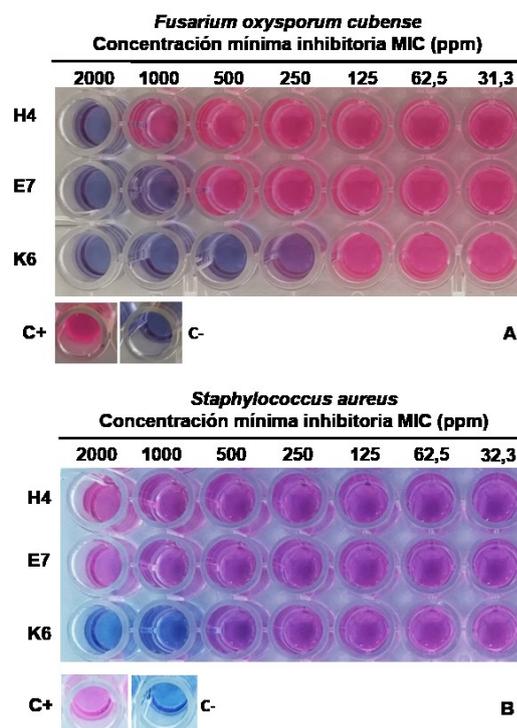
El aislado K6 mostro la potencia más alta, con 160 UA/ml para *S. aeurus* y 320 UA/ml para *Foc*, con un % de reducción de ALB de  $0.006 \pm 0.04$  y  $4.69 \pm 1.06$  respectivamente (Anexo 2). En Actinomicetos aislados en suelos, su caldo de cultivo presento inhibición antimicrobiana de 40 UA/ml contra *S. aeurus* (Parada et al., 2017), valor más bajo a los obtenidos por el aislado K6. En cuanto a los aislados E8, B7, H5, A11, F6, K3, F3 y C8, aunque en las pruebas de antagonismo presentaron una ligera capacidad inhibitoria, la mínima dilución no mostró actividad inhibitoria (<20 UA/ml). Se reporta que aislados antárticos de *Streptomyces sp.* cultivados en medio M1 inhiben el crecimiento de *Foc* en diluciones en el rango del 75 al 1.56% del medio. Se destaca que el aislado E7 identificado como *S. fildesensis* presento inhibición al 12.5% de dilución del extracto, mucho más bajo que el valor reportado para esta especie (Santos et al., 2020). En Actinomicetos aislados en suelos, su caldo de cultivo presento inhibición antimicrobiana de 40 UA/ml contra *S. aeurus* (Parada et al., 2017).



**Imagen 10** Evaluación de la potencia actividad antimicrobiana del MCF expresada en Unidades Arbitrarias por mililitro ( $UA\ ml^{-1}$ ) mediante el porcentaje de reducción de Alamar Blue. En esta prueba, el color rosado indica viabilidad celular (Control +), mientras que el color azul indica muerte celular (Control -). En la figura muestra el efecto en Foc y en la B en *S. aureus*.

#### 4.4 Concentración mínima inhibitoria

Los extractos de acetato de etilo fueron evaluados en *S. aureus* y *F. oxysporum*. Se observó que los extractos de los aislados E7 y H4 no presentaron actividad frente a *S. aureus*, mientras que el aislado K6 mostró un MIC (Concentración mínima inhibitoria) de 250 ppm para Foc. Sin embargo, para *S. aureus*, el aislado K6 presentó actividad a concentraciones mayores a 500 ppm (Imagen 11).



**Imagen 11** Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto ETAC, expresada en partes por millón (ppm), mediante el porcentaje de reducción de Alamar Blue. El color rosado indica la presencia de viabilidad celular (Control +), mientras que el color azul indica muerte celular (Control -). Los resultados se presentan para Foc en la figura A y para *S. aureus* en la figura B.

Se ha reportado previamente que los *Streptomyces* antárticos tienen una potente actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, los extractos crudos de estos microorganismos han demostrado valores amplios de MIC, que comprenden valores entre 1 mg/ml y 100 µg/ml (Singhania et al., 2017).

La identificación molecular ha relacionado al aislado K6 como *Streptomyces polyrhachii*, el cual ha sido previamente reportado como simbiote de las hormigas negras chinas (*Polyrhachis vicina Roger*), proporcionando protección a su anfitrión contra ataques de hongos que afectan a esta especie (Yu et al., 2013). Esta especie de *Streptomyces* no tiene una contraparte Antártica conocida, y hasta el momento, no se había reportado su capacidad de inhibir el crecimiento de Foc y *S. aureus*.

Por otro lado, el aislado E7 ha sido identificado como *Streptomyces fildesensis*, ha demostrado actividad antimicrobiana, con valores de MIC en el rango de 15.6 a mayores a 500 ppm para *S. aureus* (Tabla 7). Se presume que este aislado tiene la capacidad de secretar múltiples moléculas con actividad inhibitoria, lo que se refleja en los bajos valores de MIC de un extracto purificado (Núñez-Montero et al., 2019). Es relevante destacar que en estudios previos han mostrado actividad contra Foc con una MIC del 75% del sobrenadante de *S. fildesensis* (Santos et al., 2020). Mientras que el sobrenadante de nuestro aislado obtuvo una inhibición con una

concentración mínima de 12.5%, 6 veces más potente que los valores reportados. *Streptomyces fildesensis* reporta la capacidad de producción antimicrobianos frente a bacterias Gram-negativa como *Vibrio*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Salmonella*, y bacterias Gram positivas como *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* (Lavin et al., 2016). Hasta la fecha no se ha reportado el uso de esta especie como control biológico de Foc.

Por último, el aislado H4, identificado como *Embleya scabriscpora* (*Streptomyces scabriscporus*), ha demostrado poseer genes capaces de sintetizar una amplia gama de antimicrobianos (Ceapă et al., 2018). Entre los antimicrobianos reportados para esta especie se encuentra la hitachimicina (Komaki et al., 2020), la cual tienen la capacidad de inhibir a *Saccharomyces cerevisiae* (Komiyama et al., 1983). Este microorganismo se ha aislado como endófito de *Amphipterygium adstringens*, el cual ayuda al hospedero en la producción de fitohormonas, moléculas para la resistencia del estrés, sideróforos y antibióticos. (Ping et al., 2004). Se reporta actividad antifúngica del aislado H4 frente a Foc, mediante la actividad quitinolítica (1.23 U ml<sup>-1</sup>) la cual demostró un rango de inhibición de entre el 35.13% al 54.70% (Wang et al., 2015).

**Tabla 7** Concentración mínima inhibitoria de los extractos purificados expresados en ppm (µg ml<sup>-1</sup>)

Taxon más cercano (16SrARN)	Aislado	MIC ppm (µg ml <sup>-1</sup> )	
		<i>S. aureus</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Streptomyces scabriscporus</i>	H4	-	>500
<i>Streptomyces fildesensis</i>	E7	>500	>500
<i>Streptomyces polyrhachis</i>	K6	>500	250

Estudios del potencial de las Actinobacterias antárticas para la producción de biomoléculas activas han revelado la presencia de genes que incluyen PKS-II (Policétido sintasa-II), NRPS (Péptido sintetasa no ribosomal), CYP (Citocromo P450) y polienos. Estos genes son fundamentales en los procesos de producción de antimicrobianos. La Tabla 8 resume los antimicrobianos reportados por los Actinomycetos aislados en muestras de suelo de la Isla Rey Jorge.

En general, los Actinomycetos y sus biomoléculas tienen gran potencial de uso como inoculantes y biopesticidas en agricultura para el control de *Fusarium oxysporum*. Los policétidos, como la acermectina y abamectina, son antifúngicos de baja toxicidad, y alta eficiencia, y actúa en la membrana celular de Foc (Cao et al., 2018). Además, se suman enzimas líticas como quitinasas, que posee un fuerte poder inhibitorio contra Foc en concentraciones de 1.23 U.ml (Wang et al., 2015), glucanasas, celulasas, y proteasas capaces de la degradación de estructuras celular, limitando su crecimiento y desarrollo (Silva et al., 2022).

El *Streptomyces polyrhachis* (K6) obtenido en este trabajo ha demostrado potencial para ser empleado como biocontrolador para *Fusarium oxysporum*. Compuesto activo obtenidos de Actinomyces aislados de diversos nichos muestran actividad antifúngica contra especies de *Fusarium* que afectan cultivos como el banano, maíz, y tomate, y cuyos valores MIC comprenden rangos entre 6.25 a 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , valores similares a los obtenidos en este trabajo (Zheng et al., 2019; Wei et al., 2020a; Rios-Hernández et al., 2021).

Los autores concluyen que, al someter los extractos a una identificación mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) de sus moléculas activas, revelan la presencia de una mezcla compleja de moléculas. Esta complejidad química hace difícil la identificación de las moléculas antifúngicas, lo cual continua siendo una tarea en desarrollo hasta el momento (Zhu et al., 2021).

**Tabla 8** Antimicrobianos reportados de los aislados antárticos obtenidos.

Microorganismo	Antimicrobianos reportados	Referencia
<i>Streptomyces fildesensis</i>	Streptoclorina, nigericina y piericidin	(Núñez-Montero et al., 2019)
	Genes productores de actinomicina, enduracidina, cinnamicin y sideroforo albachelin (peptido)	
	Lantipeptidos, terpenos, bacteriocinas, melanina, lasso peptides, sideroforos	
<i>Streptomyces scabriformis</i>	Hitachimicina y steffimicina	(Ping et al., 2004)
		(Rodríguez-Peña et al., 2022)
<i>Streptomyces polyrhachii</i>	No se reportan antimicrobianos	(Yu et al., 2013)

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los aislados antárticos recolectados en la Isla Rey Jorge, K6, E7 y H4 fueron identificados respectivamente como *Streptomyces polyrhachii*, *Streptomyces fildesensis*, y *Streptomyces scabrissporus*, estos aislados demostraron capacidad para producir antimicrobianos e inhibir agentes infecciosos como *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* y *Staphylococcus aureus*.

El aislado K6 presentó la mayor capacidad de inhibición contra Foc, con una potencia de 320 UA/ml en el caldo de cultivo fermentado y una concentración mínima inhibitoria de 250 ppm en su extracto de etil acetato. Estos resultados son comparables a los de Actinomicetos previamente reportados e identificados como eficaces agentes de biocontrol contra Foc. El porcentaje de similitud genética encontrado para este aislado fue del 96,98% con *Streptomyces polyrhachis*, lo que se puede considerar como una baja similitud que junto a su origen podría indicar que se trata de una nueva especie que no ha sido reportada. Por lo tanto, se recomienda un análisis más profundo que involucre la secuenciación de otros genes, como *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, and *trpB*, y un análisis filogenético adicional para lograr una identificación completa de especies.

Se requiere investigaciones más exhaustivas sobre los aislados K6, E7 y H4 para comprender los mecanismos de acción de su antimicrobianos y su posible aplicación en diversos campos de la biotecnología. La caracterización de estas moléculas abrirá nuevas perspectivas para el descubrimiento de tratamientos y métodos alternativos en el ámbito del biocontrol de fitopatógenos que afectan a los cultivos del país y la región.

En resumen, este estudio aporta un valioso conocimiento a la comprensión de la diversidad microbiana presentes en la Antártida, revelando que los aislados de *Streptomyces* encontrados en este entorno posee actividades antimicrobianas potencialmente valiosas para su aplicación en el biocontrol de patógenos agropecuarios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abneuf, M. A., Krishnan, A., Aravena, M. G., Pang, K. L., Convey, P., Mohamad-Fauzi, N., et al. (2016). Antimicrobial activity of microfungi from maritime antarctic soil. *Czech Polar Reports* 6, 141–154. doi: 10.5817/CPR2016-2-13.
- Al-Ansari, M., Kalaiyarasi, M., Almalki, M. A., and Vijayaraghavan, P. (2020). Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment. *J. King Saud Univ. - Sci.* 32, 1993–1998. doi: 10.1016/j.jksus.2020.02.005.
- Al-Hatmi, A. M. S., Curfs-Breuker, I., Hoog, G. S. de, Meis, J. F., and Verweij, P. E. (2017). Antifungal Susceptibility Testing of *Fusarium*: A Practical Approach. *J. Fungi* 3. doi: 10.3390/JOF3020019.
- Alekseev, I., and Abakumov, E. (2018). Acid-base properties and mesomorphic organization of soils of the Maritime Antarctica: Fildes Peninsula (King George Island) and Ardley Island (South Shetland Islands).
- Almela, P., Justel, A., and Quesada, A. (2021). Heterogeneity of Microbial Communities in Soils From the Antarctic Peninsula Region. *Front. Microbiol.* 12, 628792. doi: 10.3389/FMICB.2021.628792/BIBTEX.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, G. P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics Biotechnol. Appl.* doi: 10.5772/62329.
- Antony, R., Sanyal, A., Kapse, N., Dhakephalkar, P. K., Thamban, M., and Nair, S. (2016). Microbial communities associated with Antarctic snow pack and their biogeochemical implications. *Microbiol. Res.* 192, 192–202. doi: 10.1016/j.micres.2016.07.004.
- Ausubel, F. M. (2002). *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology.*
- Benaud, N., Edwards, R. J., Amos, T. G., D'Agostino, P. M., Gutiérrez-Chávez, C., Montgomery, K., et al. (2021). Antarctic desert soil bacteria exhibit high novel natural product potential, evaluated through long-read genome sequencing and comparative genomics. *Environ. Microbiol.* 23, 3646–3664. doi: 10.1111/1462-2920.15300.
- Benavent-González, A., Delgado-Baquerizo, M., Fernández-Brun, L., Singh, B. K., Maestre, F. T., and Sancho, L. G. (2018). Identity of plant, lichen and moss species connects with microbial abundance and soil functioning in maritime Antarctica. *Plant Soil* 429, 35–52. doi: 10.1007/S11104-018-3721-7.
- Bhatti, A. A., Haq, S., and Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb. Pathog.* 111, 458–467. doi: 10.1016/J.MICPATH.2017.09.036.
- Bockheim, J. G. (2014). Antarctic soil properties and soilscapes. *Antarct. Terr. Microbiol. Phys. Biol. Prop. Antarct. Soils* 9783642452130, 293–315. doi: 10.1007/978-3-642-45213-0\_16/COVER.
- Bölter, M., Blume, H. P., Schneider, D., and Beyer, L. (1997). Soil properties and distributions of invertebrates and bacteria from King George Island (Arctowski Station), maritime

- Antarctic. *Polar Biol.* 1997 185 18, 295–304. doi: 10.1007/S003000050191.
- Bratchkova, A., and Ivanova, V. (2011). Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 25, 1–7. doi: 10.5504/bbeq.2011.0116.
- Brooks, S. T., Jabour, J., van den Hoff, J., and Bergstrom, D. M. (2019). Our footprint on Antarctica competes with nature for rare ice-free land. *Nat. Sustain.* 2019 23 2, 185–190. doi: 10.1038/s41893-019-0237-y.
- Bruno, S., Coppola, D., Di Prisco, G., Giordano, D., and Verde, C. (2019). Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. *Mar. Drugs* 17. doi: 10.3390/md17100544.
- Cao, X., Luo, Z., Zeng, W., Xu, S., Zhao, L., and Zhou, J. (2018). Enhanced avermectin production by *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 using high-throughput screening aided by fluorescence-activated cell sorting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 703–712. doi: 10.1007/S00253-017-8658-X/FIGURES/8.
- Ceapă, C. D., Vázquez-Hernández, M., Rodríguez-Luna, S. D., Vázquez, A. P. C., Suárez, V. J., Rodríguez-Sanoja, R., et al. (2018). Genome mining of *Streptomyces scabrisporus* NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PLoS One* 13, e0192618. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0192618.
- Cong, B., Yin, X., Deng, A., Shen, J., Tian, Y., Wang, S., et al. (2020). Diversity of Cultivable Microbes From Soil of the Fildes Peninsula, Antarctica, and Their Potential Application. *Front. Microbiol.* 11, 2182. doi: 10.3389/FMICB.2020.570836/BIBTEX.
- Correa, T., and Abreu, F. (2020). Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. *Physiol. Biotechnol. Asp. Extrem.*, 269–284. doi: 10.1016/B978-0-12-818322-9.00020-4.
- Cowan, D. A., Makhalanyane, T. P., Dennis, P. G., and Hopkins, D. W. (2014). Microbial ecology and biogeochemistry of continental antarctic soils. *Front. Microbiol.* 5, 154. doi: 10.3389/FMICB.2014.00154/BIBTEX.
- Cycoń, M., Mroziak, A., and Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front. Microbiol.* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00338.
- Da Silva, J. B., Espinal, M., and Ramón-Pardo, P. (2020). Antimicrobial resistance: time for action. *Rev. Panam. Salud Pública* 44. doi: 10.26633/RPSP.2020.131.
- Dahal, R. H., Chaudhary, D. K., Kim, D. U., Pandey, R. P., and Kim, J. (2020). *Chryseobacterium antibioticum* sp. nov. with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, isolated from Arctic soil. *J. Antibiot.* 2020 742 74, 115–123. doi: 10.1038/s41429-020-00367-1.
- Danilova, N. V., Galitskaya, P. Y., and Selivanovskaya, S. Y. (2018). Antibiotic resistance of microorganisms in agricultural soils in Russia. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Institute of Physics Publishing). doi: 10.1088/1755-1315/107/1/012054.

- Danilovich, M. E., Sánchez, L. A., Acosta, F., and Delgado, O. D. (2018). Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. *Polar Biol.* 41, 1417–1433. doi: 10.1007/s00300-018-2295-4.
- Devanshi, S., Shah, K. R., Arora, S., and Saxena, S. (2021). Actinomycetes as An Environmental Scrubber. *Crude Oil - New Technol. Recent Approaches [Working Title]*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.99187.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C. W. (2011). InfoStat. Available at: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Duarte, A. W. F., dos Santos, J. A., Vianna, M. V., Vieira, J. M. F., Mallagutti, V. H., Inforsato, F. J., et al. (2018). Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 600–619. doi: 10.1080/07388551.2017.1379468.
- Durán, P., Barra, P. J., Jorquera, M. A., Viscardi, S., Fernandez, C., Paz, C., et al. (2019). Occurrence of soil fungi in antarctic pristine environments. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 28. doi: 10.3389/FBIOE.2019.00028/FULL.
- Enrique Serrano Cañadas (2001). Espacios protegidos y política territorial en las islas Shetland del Sur (Antártida). *Boletín la Asoc. Geógrafos Españoles* 31, 5–21. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/28081106\\_Espacios\\_protegidos\\_y\\_politica\\_territorial\\_en\\_las\\_islas\\_Shetland\\_del\\_Sur\\_Antartida](https://www.researchgate.net/publication/28081106_Espacios_protegidos_y_politica_territorial_en_las_islas_Shetland_del_Sur_Antartida) [Accessed July 30, 2022].
- FAO (2019). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. Rome, Italy: FAO doi: 10.4060/ca6030es.
- FAO (2022). Banana market review – Preliminary results 2021. Rome Available at: <https://www.fao.org/3/cb9411en/cb9411en.pdf> [Accessed July 13, 2022].
- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., et al. (2015). Characterization of Trichoderma species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 81, 201–210. doi: 10.1007/s10327-015-0587-x.
- García-Bastidas, F. A., Quintero-Vargas, J. C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., et al. (2019). First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by Fusarium odoratissimum in Colombia. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN> 104. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN.
- García Valarezo, D. M., Apolo Vivanco, N. J., and Bermeo Pacheco, J. A. (2019). Evaluación económica del sector agropecuario e industrial en Ecuador 1980 – 2015. *ECA Sinerg.* 10, 116. doi: 10.33936/eca\_sinergia.v10i2.1116.
- George, S. F., Fierer, N., Levy, J. S., and Adams, B. (2021). Antarctic Water Tracks: Microbial Community Responses to Variation in Soil Moisture, pH, and Salinity. *Front. Microbiol.* 12, 616730. doi: 10.3389/FMICB.2021.616730/BIBTEX.
- Gomes, E. C. Q., Godinho, V. M., Silva, D. A. S., de Paula, M. T. R., Vitoreli, G. A., Zani, C. L., et al. (2018). Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny,

- diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles* 22, 381–393. doi: 10.1007/S00792-018-1003-1/METRICS.
- González-Rocha, G., Muñoz-Cartes, G., Canales-Aguirre, C. B., Lima, C. A., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H., et al. (2017). Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. *PLoS One* 12. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0179390.
- Hemmings, A. D., Rogan-Finnemore, M., and Gateway Antarctica. (2005). Antarctic bioprospecting.
- Hussein, A. M. S., El Sayed Ibrahim, G., and Badr, A. N. (2021). Comparative evaluation of some by-products substitution in snacks: The influence on volatiles profile and lessening aflatoxins formation. *Egypt. J. Chem.* 64, 1897–1909. doi: 10.21608/EJCHEM.2020.52472.3086.
- Ibarra-Velásquez, A. A., Ordoñez-Araque, R. H., and Landines-Vera, E. F. (2020). Ecuadorian banana industry and food import companies in Spain: a joint venture. Economic and financial feasibility analysis. *undefined*.
- Jackson, S. A., Crossman, L., Almeida, E. L., Margassery, L. M., Kennedy, J., and Dobson, A. D. W. (2018). Diverse and Abundant Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Clusters in the Genomes of Marine Sponge Derived Streptomyces spp. Isolates. *Mar. Drugs* 2018, Vol. 16, Page 67 16, 67. doi: 10.3390/MD16020067.
- Kim, E. S. (2021). Recent Advances of Actinomycetes. *Biomolecules* 11, 1–3. doi: 10.3390/BIOM11020134.
- Kim, O. S., Chae, N., Lim, H. S., Cho, A., Kim, J. H., Hong, S. G., et al. (2012). Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. *J. Microbiol.* 50, 1081–1085. doi: 10.1007/S12275-012-2655-7.
- Komaki, H., Hosoyama, A., Kimura, A., Ichikawa, N., Igarashi, Y., and Tamura, T. (2020). Classification of ‘Streptomyces hyalinus’ Hamada and Yokoyama as *embleya hyalina* sp. Nov., the second species in the genus *embleya*, and emendation of the genus *embleya*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 1591–1595. doi: 10.1099/IJSEM.0.003941/CITE/REFWORKS.
- Komiyama, K., Edanami, K. I., Tanoh, A., Yamamoto, H., and Umezawa, I. (1983). Studies on the biological activity of stubomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 36, 301–311. doi: 10.7164/ANTIBIOTICS.36.301.
- Kontro, M. H., Yaradoddi, J. S., Banapurmath, N. R., Ganachari, S. V., and Hungund, B. S. (2021). Biotechnological Importance of Actinomycetes. 271–290. doi: 10.1007/978-981-16-3353-9\_15.
- Krauze, P., Wagner, D., Yang, S., Spinola, D., and Kühn, P. (2021). Influence of prokaryotic microorganisms on initial soil formation along a glacier forefield on King George Island, maritime Antarctica. *Sci. Rep.* 11, 13135. doi: 10.1038/s41598-021-92205-z.
- Lamilla, C., Pavez, M., Santos, A., Hermosilla, A., Llanquiao, V., and Barrientos, L. (2017). Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biol.* 40, 719–726. doi: 10.1007/s00300-016-1977-z.

- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120. doi: 10.1128/AEM.00335-09/SUPPL\_FILE/SUPPLEMENTARY\_FIGURE\_AND\_TABLES.PDF.
- Lavin, P. L., Yong, S. T., Wong, C. M. V. L., and De Stefano, M. (2016). Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarct. Sci.* 28, 433–442. doi: 10.1017/S0954102016000250.
- Lawson, P. A. (2018). The Phylum Actinobacteria. *Bifidobact. Relat. Org. Biol. Taxon. Appl.*, 1–8. doi: 10.1016/B978-0-12-805060-6.00001-6.
- Li, X., Li, K., Zhou, D., Zhang, M., Qi, D., Jing, T., et al. (2021). Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* using *Streptomyces* sp. H4. *Biol. Control* 155, 104524. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2020.104524.
- Lo, A., Fani, G. R., Fontaneto, D., Schiaparelli, S., Giudice, A. Lo, and Fani, R. (2015). Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. *Hydrobiol.* 2015 7611 761, 417–441. doi: 10.1007/S10750-015-2497-5.
- Maarten van der Heijden, Peter Beyer, and Sarah Paulin (2020). *Instrumentos internacionales relativos al uso de antimicrobianos en el sector de la salud humana y los sectores animal y vegetal*. Rome, Italy: FAO, OIE y OMS Available at: <http://www.fao.org/publications> [Accessed January 18, 2021].
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Onofre, J. G., and Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the *Fusarium* Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants (Basel, Switzerland)* 9, 1–18. doi: 10.3390/PLANTS9091133.
- Malcheva, B., Nustorova, M., Zhiyanski, M., Sokolovska, M., Yaneva, R., and Abakumov, E. (2020). Diversity and activity of microorganisms in antarctic polar soils. *One Ecosyst.* 5, 1–16. doi: 10.3897/ONEECO.5.E51816.
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., and Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2, 100030. doi: 10.1016/J.CRMICR.2021.100030.
- Marcolefes, E., Leung, T., Okshevsky, M., McKay, G., Hignett, E., Hamel, J., et al. (2019). Culture-dependent bioprospecting of bacterial isolates from the canadian high arctic displaying antibacterial activity. *Front. Microbiol.* 10, 1836. doi: 10.3389/fmicb.2019.01836.
- Michel, R. F. M., Schaefer, C. E. G. R., López-Martínez, J., Simas, F. N. B., Haus, N. W., Serrano, E., et al. (2014). Soils and landforms from Fildes Peninsula and Ardley Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology* 225, 76–86. doi: 10.1016/J.GEOMORPH.2014.03.041.
- Monteiro, M. C., De La Cruz, M., Cantizani, J., Moreno, C., Tormo, J. R., Mellado, E., et al. (2012). A new approach to drug discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen.* 17,

542–549. doi: 10.1177/1087057111433459.

- Mylavarapu, R., Bergeron, J., Wilkinson, N., and Hanlon, E. A. (2020). Soil pH and Electrical Conductivity: A County Extension Soil Laboratory Manual. *EDIS* 2020. doi: 10.32473/EDIS-SS118-2020.
- Núñez-Montero, K., and Barrientos, L. (2018). Advances in antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. *Antibiotics* 7, 90. doi: 10.3390/antibiotics7040090.
- Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Abanto, M., Maruyama, F., Jorquera, M. A., Santos, A., et al. (2019). Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Sci. Rep.* 9. doi: 10.1038/s41598-019-43960-7.
- Ogaki, M. B., Coelho, L. C., Vieira, R., Neto, A. A., Zani, C. L., Alves, T. M. A., et al. (2020). Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles* 24, 227–238. doi: 10.1007/s00792-019-01148-x.
- Ogaki, M. B., Teixeira, D. R., Vieira, R., Lírio, J. M., Felizardo, J. P. S., Abuchacra, R. C., et al. (2020). Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. *Fungal Biol.* 124, 601–611. doi: 10.1016/j.funbio.2020.02.015.
- Onaka, H. (2017). Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 70, 865–870. doi: 10.1038/ja.2017.51.
- Ortiz, M., Bosch, J., Coclet, C., Johnson, J., Lebre, P., Salawu-Rotimi, A., et al. (2020). Microbial Nitrogen Cycling in Antarctic Soils. *Microorganisms* 8, 1–17. doi: 10.3390/MICROORGANISMS8091442.
- Parada, R. B., Marguet, E. R., and Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogoresistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19, 17–23. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098.
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., et al. (2021). Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Front. Microbiol.* 12, 1209. doi: 10.3389/FMICB.2021.670135/BIBTEX.
- Ping, X., Takahashi, Y., Seino, A., Iwai, Y., and Omura, S. (2004). *Streptomyces scarbrisporus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 577–581. doi: 10.1099/IJS.0.02692-0/CITE/REFWORKS.
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium wilt of banana. *Phytopathology* 105, 1512–1521. doi: 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW.
- Pratiwi, R., Hanafi, M., Artanti, N., and Pratiwi, R. (2018). Bioactivity of Antibacterial Compounds Produced by Endophytic Actinomycetes from *Neesia altissima*. *J. Trop. Life Sci.* 8, 37–42. doi: 10.11594/jtls.08.01.07.

- Pulschen, A. A., Bendia, A. G., Fricker, A. D., Pellizari, V. H., Galante, D., and Rodrigues, F. (2017). Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media. *Front. Microbiol.* 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01346.
- Qi, D., Zou, L., Zhou, D., Zhang, M., Wei, Y., Zhang, L., et al. (2021). Identification and Antifungal Mechanism of a Novel Actinobacterium *Streptomyces huiliensis* sp. nov. Against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 of Banana. *Front. Microbiol.* 12. doi: 10.3389/FMICB.2021.722661/FULL.
- Rios-Hernández, T. A., Uc-Varguez, A., and Evangelista-Martínez, Z. (2021). Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes. *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.* 39. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.2105-3.
- Rizzo, C., and Giudice, A. Lo (2020). The variety and inscrutability of polar environments as a resource of biotechnologically relevant molecules. *Microorganisms* 8, 1–37. doi: 10.3390/microorganisms8091422.
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J., and Capita, R. (2022). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology (Basel)*. 11. doi: 10.3390/BIOLOGY11010046.
- Rodríguez-Peña, K., Gómez-Román, M. P., Macías-Rubalcava, M. L., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sanoja, R., and Sánchez, S. (2022). Bioinformatic comparison of three *Embleya* species and description of steffimycins production by *Embleya* sp. NF3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106. doi: 10.1007/S00253-022-11915-0.
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., et al. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 63, 442–459. doi: 10.1038/JA.2010.78.
- Santos, A., Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Pavez, M., Quezada-Solís, D., and Barrientos, L. (2020). Antifungal activity screening of antarctic actinobacteria against phytopathogenic fungi. *Acta Biol. Colomb.* 25, 353–358. doi: 10.15446/abc.v25n2.76405.
- Schories, D., and Kohlberg, G. (2016). Marine wildlife, King George Island, Antarctica. *Dirk Schories Publ.*, 348.
- Shanthi Kumari, K., Shivakrishna, P., Al-Attar, A. M., and Ramakrishna Ganduri, V. S. (2020). Antibacterial and cytotoxicity activities of bioactive compounds from *Micrococcus* species OUS9 isolated from sea water. *J. King Saud Univ. - Sci.* 32, 2818–2825. doi: 10.1016/J.JKSUS.2020.07.003.
- Sharma, V., and Salwan, R. (2018). Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture. *New Futur. Dev. Microb. Biotechnol. Bioeng. Actinobacteria Divers. Biotechnol. Appl.*, 93–108. doi: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0.
- Silva, G. da C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. de F., and Lacava, P. T. (2022). The Potential Use of Actinomycetes as Microbial Inoculants and Biopesticides in Agriculture. *Front. Soil Sci.* 2, 833181. doi: 10.3389/FSOIL.2022.833181.
- Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A.

- L. T. G., et al. (2020). Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Sci. Reports 2020 101* 10, 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-69786-2.
- Singhania, M., Ravichander, P., Swaroop, S., Naine Selvakumar, J., Vaithilingam, M., and Devi Chandrasekaran, S. (2017). Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Property of *Streptomyces laurentii* VITMPS Isolated from Marine Soil. *Curr. Bioact. Compd.* 13, 78–81. doi: 10.2174/1573407212666160606130704.
- So, J. E., Halda, J. P., Hong, S. G., Hur, J. S., and Kim, J. H. (2023). The Revision of Lichen Flora Around Maxwell Bay, King George Island, Maritime Antarctic. *J. Microbiol.* 61, 159–173. doi: 10.1007/s12275-023-00015-x.
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., and Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS One* 14, e0210478. doi: 10.1371/journal.pone.0210478.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. doi: 10.1093/MOLBEV/MSAB120.
- Teramoto, M., Hamamoto, T., Liang, N., Taniguchi, T., Ito, T. Y., Hu, R., et al. (2022). Abiotic and biotic factors controlling the dynamics of soil respiration in a coastal dune ecosystem in western Japan. *Sci. Reports 2022 121* 12, 1–14. doi: 10.1038/s41598-022-17787-8.
- Tistechok, S., Skvortsova, M., Mytsyk, Y., Fedorenko, V., Parnikoza, I., Luzhetskyy, A., et al. (2021). The diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria isolated from the rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica* (Galindez Island, Maritime Antarctic). *Polar Biol.* 44, 1859–1868. doi: 10.1007/S00300-021-02924-2/METRICS.
- Velasco-Castrillón, A., Schultz, M. B., Colombo, F., Gibson, J. A. E., Davies, K. A., Austin, A. D., et al. (2014). Distribution and diversity of soil microfauna from East Antarctica: Assessing the link between biotic and abiotic factors. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0087529.
- Wang, J., Cai, B., Li, K., Zhao, Y., Li, C., Liu, S., et al. (2022). Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Banana Plantlets Using Newly Isolated *Streptomyces* sp. WHL7 from Marine Soft Coral. *Plant Dis.* 106. doi: 10.1094/PDIS-06-21-1275-RE.
- Wang, Q., Duan, B., Duan, B., Yang, R., Zhao, Y., Zhang, L., et al. (2015). Screening and Identification of Chitinolytic Actinomycetes and Study on the Inhibitory Activity against Turfgrass Root Rot Disease Fungi. *J. Biosci. Med.* 3, 56–65. doi: 10.4236/JBM.2015.33009.
- Wei, Y., Zhao, Y., Zhou, D., Qi, D., Li, K., Tang, W., et al. (2020). A Newly Isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 With a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *Front. Microbiol.* 11, 557315. doi: 10.3389/FMICB.2020.01712/BIBTEX.
- WHO (2016). United Nations meeting on antimicrobial resistance. *Bull. World Health Organ.*

94, 638–639. doi: 10.2471/blt.16.020916.

- Yu, C., Liu, C., Wang, X., Zhao, J., Yang, L., Gao, R., et al. (2013). *Streptomyces polyrhachii* sp. nov., a novel actinomycete isolated from an edible Chinese black ant (*Polyrhachis vicina* Roger). *Antonie van Leeuwenhoek* 2013 1046 104, 1013–1019. doi: 10.1007/S10482-013-0021-3.
- Yu, Y., Li, H. R., Zeng, Y. X., and Chen, B. (2011). Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active hydrolytic enzymes from culturable bacteria associated with sediment from Nella Fjord, Eastern Antarctica. *Mar. Drugs* 9, 184–195. doi: 10.3390/MD9020184.
- Yurkov, A. M., Sannino, C., and Turchetti, B. (2020). *Mrakia fibulata* sp. nov., a psychrotolerant yeast from temperate and cold habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113, 499–510. doi: 10.1007/S10482-019-01359-4.
- Zhang, K., Zhu, J., Li, S., Rao, M. P. N., Li, N. M., Guo, A. Y., et al. (2020). *Deinococcus detaillensis* sp. nov., isolated from humus soil in Antarctica. *Arch. Microbiol.* 202, 2493–2498. doi: 10.1007/S00203-020-01920-0/METRICS.
- Zheng, X., Wang, J., Chen, Z., Zhang, H., Wang, Z., Zhu, Y., et al. (2019). A *Streptomyces* sp. strain: Isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against soilborne diseases of tomato plants. *Biol. Control* 136, 104004. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2019.104004.
- Zhu, H., Swierstra, J., Wu, C., Girard, G., Choi, Y. H., Van Wamel, W., et al. (2014). Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of actinomycetes isolated from mountain soils. *Microbiol. (United Kingdom)* 160, 1714–1726. doi: 10.1099/MIC.0.078295-0.
- Zhu, Z., Tian, Z., and Li, J. (2021). A *Streptomyces morookaensis* strain promotes plant growth and suppresses *Fusarium* wilt of banana. *Trop. Plant Pathol.* 46, 175–185. doi: 10.1007/S40858-020-00396-Z.
- Zrnčić, S. (2020). Correct Diagnostics: Prerequisite for Prudent and Responsible Antimicrobial Administration. *Asian Fish. Sci.* 33S, 27–32. doi: 10.33997/j.afs.2020.33.s1.005.
- Zucconi, L., Canini, F., Temporiti, M. E., and Tosi, S. (2020). Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 6459. doi: 10.3390/ijerph17186459.

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Colonias de los *Streptomyces* Antárticos con capacidad de producir antimicrobianos.



**Anexo 2** Tabla de los porcentajes de reducción de ALB obtenidos de las Unidades arbitrarias por mililitro (UA ml-1) de las diluciones de los extractos de los *Streptomyces* Antárticos evaluados.

% de Reducción del Alamar Blue (Viabilidad celular)												
<i>Staphylococcus aureus</i>												
UA ml-1	20		40		80		160		320		640	
<b>H4</b>	100,00	± 2,55	100,00	± 0,05	100,00	± 1,73	100,00	± 0,05	100,00	± 8,44	100,00	± 2,70
<b>E7</b>	1,23	± 0,15	39,34	± 2,55	89,78	± 4,84	100,00	± 2,55	100,00	± 3,29	100,00	± 5,56
<b>K6</b>	0,29	± 0,11	0,00	± 0,00	0,00	± 0,28	0,06	± 0,04	13,14	± 0,40	100,00	± 10,97
<i>Fusarium oxysporum cubense</i>												
UA ml-1	20		40		80		160		320		640	
<b>H4</b>	5,52	± 0,30	19,41	± 2,19	100,00	± 3,26	100,00	± 8,42	100,00	± 0,78	100,00	± 13,93
<b>E7</b>	3,68	± 0,09	2,09	± 0,33	0,98	± 0,41	100,00	± 4,22	100,00	± 4,43	100,00	± 9,03
<b>K6</b>	0,94	± 0,36	0,86	± 0,36	0,95	± 0,56	0,45	± 0,89	4,69	± 1,06	15,17	± 5,64

**Anexo 3** Tabla de los porcentajes de reducción de ALB obtenidos de las Concentración mínima inhibitoria (MIC) expresada en ppm de los extractos ETAC de los Streptomyces Antárticos evaluados.

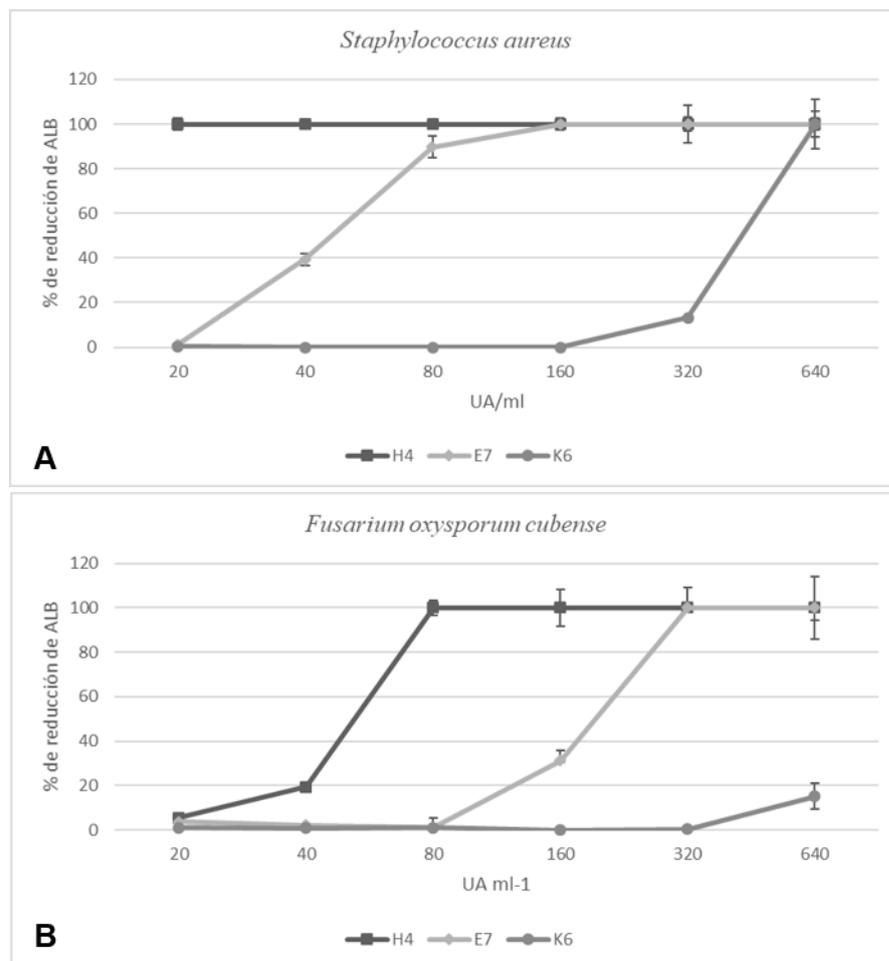
*Staphylococcus aureus*

ppm (ug/ml)	2000		1000		500		250		125		62,5		31,3	
<b>H4</b>	100,00	± 6,07	100,00	± 1,84	100,00	± 5,74	100,00	± 9,59	100,00	± 5,73	100,00	± 7,79	100,00	± 7,42
<b>E7</b>	100,00	± 4,16	94,67	± 4,44	100,00	± 4,56	100,00	± 3,46	100,00	± 5,43	100,00	± 2,62	100,00	± 7,4
<b>K6</b>	3,08	± 1,42	9,62	± 2,75	80,57	± 8,43	93,86	± 3,22	99,00	± 2,97	100,00	± 1,81	100,25	± 4,84

*Fusarium oxysporum cubense*

ppm (ug/ml)	2000		1000		500		250		125		62,5		31,3	
<b>H4</b>	4,24	± 0,17	65,36	± 2,31	92,37	± 0,82	96,92	± 0,51	91,10	± 0,71	90,76	± 0,81	90,76	± 0,68
<b>E7</b>	1,43	± 0,13	9,21	± 0,40	95,81	± 1,00	93,48	± 1,02	93,64	± 0,40	94,36	± 0,46	94,36	± 0,04
<b>K6</b>	1,19	± 0,14	0,00	± 0,13	0,00	± 0,12	24,63	± 0,69	100,41	± 1,48	99,53	± 0,18	99,53	± 1,15

**Anexo 4.** Graficas de Unidades Arbitrarias frente al % de reducción de Alamar Blue. A: En el caso de *S. Aureus* se observa que el aislado K6 mantiene la reducción de ALB hasta los 160 UA ml<sup>-1</sup>, en comparación a los aislado E7 y H4 que tiene una inhibición hasta máxima de 20 UA ml<sup>-1</sup> para E7, H4 no presenta inhibición del microorganismo. B: En el caso de *Foc* se observa que el aislado K6 mantiene la reducción de ALB hasta los 320 UA ml<sup>-1</sup>, en comparación de E7 y H4, que presentaron una máxima inhibición 20 y 80 UA ml<sup>-1</sup> respectivamente



**Anexo 5** Lista de aislados subidos a la base de datos de secuencias “GENBANK” del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

<b>Código del aislado</b>	<b>Número de accesión del GenBank</b>	<b>Taxon más cercano (16SrARN)</b>	<b>Porcentaje de identidad (%)</b>
H4	OQ623316	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	99,13
H5	OQ623317	<i>Streptomyces fildesensis</i>	99,11
E7	OQ623319	<i>Streptomyces fildesensis</i>	99,4
A11	OQ623321	<i>Streptomyces fildesensis</i>	100
F6	OQ623323	<i>Streptomyces fildesensis</i>	100
K3	OQ623315	<i>Streptomyces sp.</i>	99,85
F3	OQ623318	<i>Streptomyces polyrhachis</i>	96,91
K6	OQ623322	<i>Streptomyces polyrhachis</i>	96,98
C8	OQ623320	<i>Streptomyces nojiriensis</i>	99,91

**Anexo 6.** Tabla de código RAL que se obtuvieron las colonias de microorganismos Antárticos aislados.

RAL3013	RAL1001	RAL3033	RAL1003	RAL1014	RAL9002	RAL7032	RAL2013
RAL1001	RAL1001	RAL7044	RAL1012	RAL7032	RAL7044	RAL1005	RAL7004
RAL1005	RAL1001	RAL1015	RAL3012	RAL7004	RAL1013	RAL7042	RAL7004
RAL8004	RAL3033	RAL7030	RAL1001	RAL7032	RAL9002	RAL7044	RAL1011
RAL7006	RAL1012	RAL3028	RAL1013	RAL1019	RAL7004	RAL7038	RAL1002
RAL1005	RAL3014	RAL3012	RAL1013	RAL3033	RAL7044	RAL7032	RAL7034
RAL1005	RAL7034	RAL3012	RAL7044	RAL7032	RAL7044	RAL7044	RAL7044
RAL9005	RAL7044	RAL7038	RAL4009	RAL1001	RAL7032	RAL7044	RAL3033
RAL1001	RAL7044	RAL1019	RAL1015	RAL7038	RAL7044	RAL1013	RAL1002
RAL1001	RAL1019	RAL7030	RAL1019	RAL3033	RAL7032	RAL1001	RAL3027
RAL1017	RAL1011 BR	RAL7032	RAL7044	RAL7030	RAL7044	RAL9002	RAL7044
RAL1012	RAL1001	RAL7030	RAL8023	RAL8001	RAL7032	RAL7044	RAL1019
RAL7030	RAL1019	RAL1020	RAL8003	RAL9006	RAL7044	RAL1013	RAL7044
RAL1024	RAL7044	RAL1014	RAL7038	RAL7044	RAL1000	RAL7032	RAL1001
RAL7044	RAL1024	RAL1000	RAL7044	RAL3014	RAL3012	RAL2011	RAL7032
RAL1012	RAL1007	RAL70044	RAL7034	RAL7032	RAL7005	RAL1037	RAL7044
RAL7044	RAL7032	RAL1012	RAL7044	RAL1001	RAL7032	RAL2013	RAL3033
RAL1002	RAL7044	RAL9006	RAL1004	RAL7044	RAL1015	RAL7032	RAL1001
RAL7038	RAL1019	RAL7044	RAL7038	RAL7032	RAL1002	RAL1003	RAL7044
RAL7044	RAL7030	RAL7034	RAL7044	RAL1004	RAL7032	RAL9005	RAL1019
RAL7004	RAL7000	RAL1013	RAL7034	RAL2011	RAL1019	RAL7038	RAL7030
RAL1005	RAL3012	RAL1013	RAL1001	RAL1013	RAL2003	RAL1005	RAL1013
RAL3012	RAL7044	RAL7044	RAL1000	RAL3012	RAL1005	RAL7044	RAL3033
RAL1000	RAL1004	RAL1012	RAL7032	RAL7032	RAL7032	RAL7044	RAL3012

**Anexo 7.** Actividad antifúngica de los MFC frente a la colonia de Foc. En comparación con el control (C), se puede observar una retracción de las hifas de la colonia en los alrededores de los pocillos donde se inocularon los caldos de los aislados K6, E7, y H4.

