Streptomyces* asociados a nidos de *Nasutitermes costalis y Nasutitermes acajutlae

(Isoptera: Termitidae) en tres zonas ecológicas de Puerto Rico

Por

Carolina Riascos Cuero

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

En

BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2014

Aprobado por:

_____	_____
Rafael Montalvo Rodríguez, PhD Miembro del Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Carlos Rodríguez Minguela, PhD Miembro del Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Matías J. Cafaro, PhD Presidente del Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Nanette Diffoot Carlo, PhD Directora del Departamento	Fecha
_____	_____
Roberto Vargas, PhD Representante Escuela Graduada	Fecha

Resumen

El éxito ecológico de muchos insectos en áreas tales como la reproducción, la defensa contra patógenos y el suministro de nutrientes, se relaciona con simbiosis con bacterias del género *Streptomyces* (Actinobacteria). Estudios anteriores encontraron una comunidad específica de *Streptomyces* asociadas a nidos de *Nasutitermes costalis*. Esta investigación se basa en determinar la diversidad de la comunidad de *Streptomyces* en dos especies de termitas comunes en Puerto Rico: *N. costalis* y *N. acajutlae* y en tres zonas ecológicas: bosque húmedo, bosque seco y manglar. Se aislaron 1,666 colonias, de las cuales se determinaron 603 morfotipos macroscópicamente y 13 microscópicamente. Se analizaron las cepas obtenidas mediante la técnica de BOX-PCR y se construyó un dendrograma que mostró 42 grupos; el 57% de ellos contienen cepas que estaban relacionados con las tres zonas ecológicas y las dos especies de termitas. El otro 43% sólo se relaciona con una zona específica o una especie de termita específica. El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA confirmó que las cepas aisladas pertenecen al género S*treptomyces*. Los índices de diversidad mostraron una comunidad diversa de *Streptomyces* para cada zona ecológica y cada especie de termita; no hay un grupo o cepa de *Streptomyces* dominando la comunidad en los nidos de estas termitas. También se evaluó la capacidad de las cepas de *Streptomyces* de degradar celulosa y se realizó un análisis de micronutrientes del nido con el fin de determinar un posible papel nutricional. El 90% de las cepas aisladas tienen la capacidad de degradar la celulosa. Los nutrientes Ca, K, Mg y NH4 + difieren en los nidos de ambas especies de termitas explicando la variación que se observa entre los nidos. Esta investigación es el primer estudio que identifica las cepas aisladas de *Streptomyces* de los nidos de dos especies diferentes de termitas arbóreas en tres diferentes zonas ecológicas de Puerto Rico.

Abstract

The ecological success of many insects in their reproduction, defense against pathogens and nutrient supply is related to symbiotic relationships with bacteria in the genus *Streptomyces* (Actinobacteria). Previous studies have established that a specific community of *Streptomyces* was associated with nests of *Nasutitermes costalis*. This research focused on the diversity of the community of *Streptomyces* in two species of termites common in Puerto Rico: *N. costalis* and *N. acajutlae* in three ecological zones: rainforest, dry forest and mangrove. A total of 1666 colonies were isolated; and 603 macroscopically and 13 microscopically morphotypes were determined. Isolated strains were analyzed with the BOX-PCR technique and a dendrograma showing 42 groups was constructed; 57% of these groups contain isolated strains that were recovered from the three ecological zones and both species of termites. The remaining 43% of the groups were associated with a specific zone or with a specific termite species. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA confirmed that the isolated strains belong to the genus *Streptomyces*. The diversity indices analysis showed a diverse community of *Streptomyces* for each ecological zone and each termite species; however, no group of *Streptomyces* dominates the community. In addition, cellulose degradation capacity of selected strains and micronutrient composition of the nest were evaluated in order to determine a possible nutritional role. The results determined that 90% of the isolated strains have the ability to degrade cellulose. Nutrients differ between the nests of the two termite species and Ca, K, Mg and $NH4^{+}$ drive the variation between them. This investigation is the first to identify isolated strains of *Streptomyces* from the nests of two different species of arboreal termites in three different ecological zones of Puerto Rico.

Carolina Riascos-Cuero ©

Dedicatoria

Dedico esta nueva conquista a la mujer que me vio nacer,

a mi amiga y confidente. Por siempre; mi madre.

A mi familia y amigos en Colombia y Puerto Rico.

……y aquellos que ya no están pero que siempre creyeron que era posible.

Agradecimientos

Quiero dar gracias incondicionales a todas esas personas que hicieron posible esta investigación con su apoyo y conocimiento. A mis estudiantes subgraduados por creer en este mi cuento: Nicolle M. Arroyo Lluberas, Katiria Bonilla Miranda, Louis M. Maldonado Pérez, Ninochka Navedo Guzmán, Eduard H. Valdes y Ricardo A. Pineda. A Magaly Zapata por hacerme la vida más fácil. A José Almodóvar por suministrar las mejores condiciones, para obtener las mejores fotos. A Delvis Pérez Almodóvar y al Dr. Ricardo Goenaga por su ayuda en los análisis químicos de esta investigación. A los gorditos: Josué Santiago, Mariely Medina, Emanuel Méndez, Karla Márquez, Merilyn Martínez y Laritza Sanabria por su colaboración incondicional, por transportarme, por alimentarme, por escucharme, por invitarme y por hacerme parte de ellos. A mis amigos compatriotas e internacionales latinoamericanos por llenar los vacíos en los fines de semana de eterna soledad de Mayagüez: Margarita Marroquín, Olga González, Yolima Arenas, Marcelino Guachambala, Natalia Cerón y Edward Gurrero. También agradezco a los miembros del laboratorio de simbiosis por hacer de este trayecto un camino encantador; a mi familia y amigos en Colombia que en la distancia creen y piensan en mí. A la "National Science Foundation" (NSF). A la Universidad de Puerto Rico.

…..Y un agradecimiento muy especial para Matías Cafaro hombre excepcional y único que respondió a mi llamado y me guío hasta aquí.

Gracias.

Tabla de Contenido

Resumen…… ii

Abstract…… iii

Dedicatoria…….. v

Agradecimientos…….. vi

Tabla de contenido …….. vii

Lista de Tablas ……. x

Lista de Figuras …….. xi

Lista de apéndices …….. xiii

1. Introducción……. 1

1.2. Hipótesis……..... 7

1.3. Objetivo general……..... 7

1.3.1. Objetivos Específicos……... 7

2. Materiales y Métodos…….. 8

2.1. Muestreo……. 8

2.2. Áreas de Muestreo……. 8

2.2.1. Bosque Seco de Guánica …… 8

2.2.2. Manglar Joyuda……. 8

2.2.3. Bosque Húmedo Mayagüez…… 9

2.3. Aislamiento del Género *Streptomyces*…….. 10

2.4. Identificación Macroscópica y Microscópica de las Cepas de Streptomyces Aisladas de los Nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae*…… 12

2.4.1. Caracterización Macroscópica…… 12

2.4.2. Caracterización Microscópica…… 12

2.5. Extracción de ADN……... 13

2.6. Caracterización Molecular de las Cepas de *Streptomyces* Aisladas de los nidos de *Nasutitermes* …… 13

2.6.1. Técnica BOX-PCR…… 13

2.6.2 Identificación Molecular…… 14

2.6.3. Amplificación del Gen 16S Ribosomal…… 15

2.6.4. Secuenciación del Gen 16S Ribosomal…… 15

2.6.5. Análisis de secuencias …… 15

2.7. Degradación de Celulosa…… 16

2.8. Análisis químico del material del nido…….. 16

2.8.1. Determinación N-NH4+ y –NO3- …… 17

2.8.2. Determinación del Fósforo…… 17

2.8.3. Determinación de K, Ca, Mg……... 18

2.8.4. Determinación de Fe, Mn y Zn……. 18

2.8.5. Determinación de Carbono Orgánico y Materia Orgánica…… 18

2.8.6. Determinación de pH del Material del Nido en H2O……... 19

2.9. Fotografía Electrónica de Barrido del Material del Nido de *Nasutitermes costalis*……... 19

2.10. Análisis estadístico…… 20

2.10.1. Análisis Estadístico para Caracterización Macroscópica……. 20

2.10.2. Análisis Estadístico para Caracterización Molecular……. 20

2.10.3. Análisis Estadístico para Material del Nido…… 20

3. Resultados…… 20

3.1. Identificación de la Especie para Cada Nido Muestreado…… 20

3.2. Colonias Aisladas de los Nidos de *Nasutitermes*…… 21

3.3 Caracterización Macroscópica……. 22

3.3.1. Abundancia de Morfotipos……... 23

3.4. Análisis Molecular con BOX-PCR……. 25

3.5. Caracterización Microscópica……. 33

3.6. Análisis Filogenético a Partir del 16S Ribosomal…….. 36

3.7. Capacidad de Degradar Celulosa…….. 41

3.8. Análisis Químico del Material del Nido…… 42

3.9. Índices de Diversidad…… 47

3.10. Microscopia Electrónica…….. 50

4. Discusión……. 50

5. Conclusiones…… 57

Bibliografía……. 58

Apéndices……. 64

Lista de Tablas

Tabla 1. Ubicación GPS de los nidos muestreados de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda)…….. 11

Tabla 2. Concentración de los reactivos para reacción de PCR…… 14

Tabla 3. Totales de colonias aisladas por nido, dato con que se calculo la frecuencia relativa de los morfotipos expuestos en las Figuras 6 y 7…….. 24

Tabla 4. Clasificación de morfotipos de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo) Mayagüez, BS (Bosque Seco) Guanica y M (Manglar) Joyuda a partir de características microscópicas, los morfotipos diferente fueron clasificados con letras. En la Tabla también se muestra fotografías de cada uno de los criterios de clasificación.
…… 34

Tabla 5. Análisis del material de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico, bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda)…… 43

Tabla 6. Análisis de componentes principales correlacionando con cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX PCR) con los elementos del material de los nidos…… 45

Tabla 7. Índices de diversidad de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda) para la zona ecológica. (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX PCR). 48

Tabla 8. Índices de diversidad de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda) para la especie de termita. (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX PCR)…….. 49

Lista de Figuras

Figura 1. Área de muestreo de donde se tomó material de nidos de dos especies de termitas, *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas del oeste de Puerto Rico Rico; Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda)…….. 10

Figura 2. Esquema del método utilizado para determinar la morfología microscópica de las cepas de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda)…… 12

Figura 3. Cabezas de soldados de las dos especies de termitas utilizadas en esta investigación, a partir de las cuales se realizó la identificación respectiva de la especie. (**A)** *Nasutitermes costalis* Cabeza con seis setas uniformemente espaciadas. **(B)** *Nasutitermes acajutlae* cabeza cubierta con docena de setas erectas…… 21

Figura 4. Porcentaje de colonias de bacterias, aisladas de 10 nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda). El total de 1666 colonias es de los dos muestreos realizados.…… 22

Figura 5. Morfotipos aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar). M4 es un nido adicional que se realizó en el primer muestreo en el manglar y pertenece a la especie de termita *Nasutitermes acajutlae*…… 23

Figura 6. Frecuencia relativa de morfotipos dominantes en el primer muestreo en nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar)……... 24

Figura 7. Frecuencia relativa de morfotipos dominantes segundo muestreo en nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar)……..... 25

Figura 8. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST……. 27

Figura 9. Diagrama de Venn que muestra los grupos formados en el dendrograma realizado a partir de el patrón de bandas de cepas de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) (Figura 8)…… 33

Figura 10. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco

(Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del Gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining…… 37

Figura 11. Prueba de celulosa a cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda)…… 42

Figura 12. Componentes examinados de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico en tres zonas ecológicas de Puerto Rico, bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda) que mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico (Kruskal-Wallis). (A) Ca ug/g; **(B)** Mg ug/g **(C)** Mn ug/g; **(D)** Zn ug/g **(E)** NO3- ppm…… 44

Figura 13. Análisis de componentes principales, correlacionando con cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). (Como variable se utilizo los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX PCR) con la composición del material de los nidos…….. 46

Figura 14. Fotografía microscopia electrónica de la parte interna de un nido de *Nasutitermes costalis* del bosque húmedo (Mayagüez). Se observan estructuras que por su tamaño se puede inferir que se trata de bacterias en íntima asociación del material del nido……... 64

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Caracterización de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres Zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque Húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda)…… 64

Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo (Mayagüez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda))……. 71

1. Introducción

Actinobacteria es uno de los grupos bacterianos filogenéticamente más numerosos (Ludwig y Klenk, 2005); comprende 6 órdenes, 39 familias y más de 300 géneros (Gao y Radhey, 2005). Estas bacterias son de gran importancia para los seres humanos porque causan enfermedades tanto a animales como a plantas; por ejemplo *Corynebacterium diphtheriae* causa difteria, *Mycobacterium tuberculosis* produce tuberculosis y *Propionibacterium acnes* es un agente causante del acné (Gao y Radhey, 2005; Leyden, 2001). También son utilizadas en la agricultura como agentes de biocontrol por su capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas y peroxidasas, evitando así el uso excesivo de pesticidas (Baharlouei et al., 2010; Sadeghi et al., 2006; Márquez et al., 2002). Pero quizás la característica más importante de las actinobacterias, es su capacidad para producir metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen propiedades antibióticas (León et al., 2007; Hassan y Wellington, 2009; Magarvey et al., 2004, Ningthoujam et al., 2009). De todos los antibióticos comerciales generados por actinobacterias, el 80% es producido por especies de *Streptomyces* completando con pequeñas contribuciones de otras especies en los géneros *Actinoplanes, Amycolatopsis, Micromonospora, Nocardia* y *Saccharopolyspora* (Hassan y Wellington, 2009).

El género *Streptomyces* fue propuesto por Waksman y Henrici en 1943 (Hassan y Wellington, 2009). Se clasifica dentro del orden Actinomicetales y es el género tipo de la familia Streptomycetaceae (Ludwig y Klenk, 2005). Las especies de este género se componen de bacterias Gram positivas aerobias con un alto porcentaje de GC en su ADN (69±78 mol%). Producen un micelio ramificado a nivel del sustrato el cual, al madurar, forma filamentos aéreos que se componen de cadenas de esporas; por ello las colonias en medio solido, al principio se

observan como una superficie suave, pero más tarde por el desarrollo del micelio aéreo se ven granuladas, polvorientas o aterciopeladas (Kämpfer, 2006).

Las especies que pertenecen al género *Streptomyces* tienen la capacidad de producir una variedad de pigmentos que le van a dar el color característico al micelio aéreo y al medio donde se cultivan. Estos pigmentos van a cambiar dependiendo de la composición del medio (Mohanasrinivasan et al., 2013; Amal et al., 2011; Dastager et al., 2006; Scribner et al., 1973). Estas bacterias son quimioorganotrofas y la mayoría de ellas pueden degradar sustratos como la caseína, gelatina, hipoxantina, almidón y también celulosa. Además, utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos como única fuente de carbono para la obtención de energía (Efthimiou et al., 2008).

Los metabolitos secundarios son moléculas bioactivas relacionadas con la ecología de grupos de microorganismos específicos. No intervienen en las funciones del metabolismo primario (O'Brien y Wright, 2011), sin embargo estudios en *Streptomyces* afirman que éstos concuerdan o se anteponen al desarrollo de hifas aéreas y su regulación (Bibb, 2005). Son un elemento esencial en nuestra sociedad dado que pueden ser utilizados como antibióticos, pigmentos y toxinas (Demain, 1998).

Asimismo los metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces* son esenciales en el desarrollo de muchos insectos, los cuales han desarrollado relaciones simbióticas con algunas especies de estas bacterias (Klepzig et al., 2009). Estas relaciones le han permitido establecer el éxito reproductivo y adaptativo a nuevos ambientes y a diferentes fuentes de alimento; por ejemplo, Kaltenpoth et al., (2005) reportó la simbiosis mutualista entre una nueva especie de *Streptomyces* y la avispa europea *Philanthus triangulum* que se caracteriza por anidar en cuevas en el suelo. Se encontró esta asociación en dos especies distintas del mismo género de

avispa donde *Streptomyces* endosimbióticos, asociados a sus antenas y depositados en la cueva de crianza, protegen las larvas de ataques de hongos patógenos. Esta asociación mutualista con *Stretomyces* parece tener un origen temprano, posiblemente durante la evolución del género *Philanthus.*

Otro caso similar se presenta en el escarabajo del pino, *Dendroctonus frontalis,* el cual participa en una simbiosis benéfica con el hongo *Entomocorticium* del cual se alimentan sus larvas. El insecto promueve el desarrollo del hongo con la presencia de actinobacterias del género *Streptomyces* en los túneles donde sucede la ovoposición, evitando así el crecimiento de *Ophiostoma minus,* hongo antagonista del hongo nutricio de las larvas (Scott et al., 2008). Por último es importante resaltar; quizás una de las simbiosis más conocidas y extraordinarias. Hormigas de la tribu Attini cultivan un hongo mutualista del cual se alimenta la colonia, este hongo es parasitado por otro hongo del género *Escovopsis* el cual destruye y ataca el cultivo fúngico. Este ataque pone en peligro la fuente de alimento de las hormigas, por esta razón han desarrollado estrategias de defensa a través de una relación mutualista con actinobacterias del género *Pseudonocardia* productoras de antibióticos capaces de inhibir al parásito (Cafaro et al., 2011).

Estos tres ejemplos muestran como dos géneros de actinobacterias, *Streptomyces* y *Pseudonocardia,* son adecuados simbiontes en la defensa de insectos, por su versatilidad metabólica, pocos requerimientos nutricionales y la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas (Kaltenpoth, 2009).

Las termitas son otro paradigma dentro de los insectos; se clasifican en el suborden Dictióptera (Korb, 2008), son insectos eusociales que cooperan en la cría de sus juveniles y comparten los

recursos alimentarios, cada miembro realiza una función y carece de la función del otro (Eggleton, 2011). Se distribuyen en dos grupos, termitas inferiores con 6 familias: Mastotermitidae (con una sola especie: *Mastotermes darwiniensis*), Hodotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae y termitas superiores con la familia Termitidae en la que se encuentra el 75% de las especies conocidas (Eggleton, 2011; Ohkuma et al., 2001; Korb, 2008). Viven en colonias con un componente inerte denominado nido el cual construyen para protegerse de enemigos naturales y la deshidratación que podrían sufrir a causa del aire, por la delgadez de su cutícula (Scheffrahn et al., 2005). Ecológicamente hay dos tipos de termitas, unas que viven en su alimento y pasan su vida entera en una sola pieza de madera llamadas "One-piece" (OP) y otras que forrajean para conseguir su alimento, las "Multiple-piece" (MP); el género *Nasutitermes* de la familia Termitidae forma parte de las MP que tienen nidos más longevos por la posibilidad de salir de ellos a buscar alimento (Korb, 2008).

Nasutitermes (Termitidae) es el género más grande de las termitas. Cada especie se divide en tres castas principales: reproductoras (reinas, reyes y alados) que salen de la colonia cuando son adultos en un vuelo nupcial y establecen una nueva colonia; las obreras que alimentan a las otras castas y se encargan de construir y reparar el nido y los soldados que defienden el nido frente a competidores y depredadores (Etcheverry et al., 2010). En particular, los soldados de este género tienen sus mandíbulas reducidas y poseen una trompa larga y puntiaguda llamada *nasute*, por el cual expulsan una secreción viscosa y pegajosa producida por una glándula frontal compuesta de mono-, di- y sesquiterpenos como medio de defensa (Costa-Leonardo et al., 2009; Fuller et al., 2003). La secreción de sustancias químicas en las termitas también es relevante en la organización de las colonias pues al ser ciegas, su comunicación depende de una amplia

variedad de compuestos secretados por glándulas exocrinas que se encuentran por todo su cuerpo, esta comunicación se refleja en actividades como reconocimiento, busca de alimento, defensa, atracción y regulación de castas (Costa-Leonardo et al., 2009).

En el paisaje de Puerto Rico es normal observar grandes termiteros en las copas de los árboles. Pertenecen a dos especies de termitas que hacen parte del genero *Nasutitermes* y son las más comunes, *Nasutitermes costalis* (Holmgren) y *Nasutitermes acajutlae* (Motschulsky). *Nasutitermes costalis* se encuentra principalmente en bosques submontanos de Puerto Rico, construye nidos de cartón frágiles; mientras que *N. acajutlae* habita zonas costeras secas y sus nidos de cartón presentan paredes exteriores fuertes y resistentes (Scheffrahn et al., 2003). Para estas dos especies los nidos son un elemento importante, les proporcionan un ambiente cerrado con una conexión mínima con el exterior protegiéndolas de adversidades del ambiente y de depredadores (Noirot y Darlington, 2000).

Esto nidos son construidos con madera y heces fecales y su cohesión es conseguida con secreciones salivales de las termitas (Noirot y Darlington, 2000). Esta composición permite la absorción de agua conservando una humedad relativamente alta que evita la deshidratación de las termitas (Suiter et al., 2009); pero a su vez favorece el desarrollo de otros microorganismos oportunistas como hongos y bacterias.

Méndez (2012) aisló y secuenció (gen 16S ribosomal) actinobacterias del nido, del intestino y del exosqueleto de *Nasutitermes costalis* y encontró *Streptomyces* en los nidos, diferentes a los aislados del exosqueleto y el intestino de la termita; además las secuencias de los *Streptomyces* del gen 16S ribosomal no fueron similares a ninguna especie o cepa ya reportada en las bases de datos. Debido a que se sabe que otros insectos sociales establecen relaciones

simbióticas mutualistas con bacterias de este género que los van a beneficiar en aspectos como reproducción, defensa contra patógenos y suministro de nutrientes surgió la pregunta ¿Qué tan diversa, estable y particular es la comunidad de *Streptomyces* asociados a los nidos de estas termitas? Para responder esta pregunta se seleccionaron nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* de tres ambientes diferentes: bosque húmedo, manglar y bosque seco.

Bajo esta premisa, determinar la diversidad de *Streptomyces* asociados a los nidos de estas dos especies de termita ayuda a identificar un posible grupo de bacterias simbiontes que pueden estar cumpliendo un rol específico en estos nidos. Adicionalmente, se determinó la capacidad de estos *Streptomyces* de degradar celulosa y se estableció la composición del nido para entrever un posible papel nutricional de la presencia de estas bacterias en el nido.

Es importante entender la ecología de estas dos especies de termitas, por su papel como descomponedores de celulosa, uno de los materiales más recalcitrantes sobre el planeta tierra. Además las termitas también pueden convertirse en plagas; el conocer la comunidad de *Streptomyces* los cuales podrían estar jugando un papel importante en la ecología de estas termitas sirviendo como base en el futuro desarrollo de métodos de control.

1.2. Hipótesis

La comunidad de *Streptomyces* asociada a los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* es específica para cada especie de termita; sin que el ambiente este aportando a la diversidad de este grupo de bacterias.

1.3. Objetivo General

Determinar la diversidad de especies del género *Streptomyces* en nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutleae* en tres zonas ecológicas: bosque húmedo, bosque seco y manglar.

1.3.1. Objetivos Específicos

- Identificar los diferentes morfotipos de cepas del género *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas a partir de características macro y microscópicas.
- Caracterizar molecularmente los morfotipos de cepas del género *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en las tres zonas ecológicas mediante la técnica de BOX-PCR y secuenciación de ADN.
- Realizar pruebas de degradación de celulosa de cepas del género *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en las tres zonas ecológicas y analizar la composición química de los nidos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Muestreo

Se tomaron muestras de 3 nidos de termitas seleccionados aleatoriamente en tres zonas ecológicas del oeste de Puerto Rico; bosque húmedo en Mayagüez, bosque seco de Guánica y en el manglar de Joyuda. En cada zona fueron muestreados los mismos nidos durante dos años consecutivos; en el 2011 en los meses de junio y julio y en el 2012 en el mes de septiembre. En el año 2011 en el mes de julio se muestreo un nido adicional en el manglar de Boquerón. No se tuvo en cuenta la época del año, dado que las muestras fueron tomadas de la parte interna del nido, el cual es un ambiente cerrado con temperatura y humedad relativamente constante (Noirot y Darlington, 2000). Se determinó su posición geográfica por medio de un sistema de posicionamiento global (GPS) (Tabla 1). Se tomó material interno de los nidos en frascos estériles, con guantes de látex y la ayuda de una espátula previamente desinfectada con alcohol al 70% entre cada toma de muestra. Se tomaron termitas de la casta de los soldados para la identificación de la especie, las cuales fueron conservadas en viales con alcohol al 70% e identificadas según Scheffrahn et al., (2003).

2.2. Áreas de Muestreo

2.2.1. Bosque Seco de Guánica

Es la zona más árida de Puerto Rico y se encuentra localizado al suroeste del país. Abarca los pueblos de Guánica, Guyanilla, Yauco, Peñuelas y un pequeño lote de Ponce; su precipitación anual es de 760 milímetros (mm); en época seca entre los meses de diciembre y abril es sólo el 10% del promedio anual, la temperatura promedio es de 25 °C con una mínima en enero de 16 °C y una alta en julio de 33 °C. En su vegetación predominan los cactus, árboles y

arbustos espinosos (Figura 1) (Declaración de impacto ambiental, Estratégica JCA – 09 – 0010 PR).

2.2.2. Manglar Joyuda

Se encuentra ubicado a cinco millas de Mayagüez-Puerto Rico. Pertenece al municipio de Cabo Rojo; este ambiente tiene una precipitación anual promedio de 1600mm y presenta una temperatura en el aire que fluctúa entre 20 °C y 26 °C. Su vegetación está constituida de mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y mangle blanco (*Laguncularia racemosa*). La especie dominante es *Rhizophora mangle*. El contenido de sedimentos está compuesto principalmente por arcilla, con porcentajes bajos en materia orgánica y arena. Posee un promedio de salinidad alrededor del 10% con una cantidad de oxígeno disuelto en el agua de 5.5ppm (Figura 1) (Estado Libre Asociado PR, Departamento de Recursos Ambientales, Hojas de Nuestro Ambiente P 904).

2.2.3. Bosque Húmedo Mayagüez

Localizado en la costa oeste de Puerto Rico, se identifican dos zonas ecológicas Bosque Húmedo Subtropical y Bosque Muy Húmedo Subtropical. Presenta un promedio de precipitación anual de 1000 a 2200 mm con una temperatura promedio de 28°C. La vegetación es de tipo boscoso y se caracteriza por especies invasoras no nativas y de rápido crecimiento. Las especies de plantas que se encuentran con mayor frecuencia son los helechos (*Gleichenia bifida)*, la Palma real (*Roystonea borinquena*), el Roble blanco (*Tabebuia heterophylla*) y un gran número de especies epífitas que crecen sobre los arboles y rocas debido a la alta humedad del ambiente (Figura 1) (Plan de Ordenación Territorial del Municipio de Mayagüez, septiembre 2006).

Figura 1. Área de muestreo de donde se tomó material de nidos de dos especies de termitas, *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas del oeste de Puerto Rico Rico; Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda).

2.3. Aislamiento del Género *Streptomyces*

En el laboratorio se realizaron diluciones seriales decimales con un gramo del material del nido, previamente macerado en morteros esterilizados. Las diluciones se efectuaron en tubos de 9mL de agua peptonada al 1%; de cada dilución se transfirió 500 µL a un plato petri con un medio semiselectivo de quitina para bacterias del género *Streptomyces*, que contiene como única fuente de carbono la quitina. Para inhibir el crecimiento de hongos se le adicionó ciclohexamida al 0.5% y nistatina al 2%. Los platos se inocularon mediante la técnica de esparcido y se incubaron a 25°C durante 5 días. Las colonias con morfología polvorienta característica del género *Streptomyces* fueron transferidas a medio nutritivo YMEA (4g extracto de levadura, 10g extracto de malta, 4g dextrosa, 20g agar por 1000mL de agua) para provocar el desarrolló de caracteres morfológicos típicos del género *Streptomyces*.

Los morfotipos de las colonias se determinaron a partir de las diferencias en color, forma, margen y elevación; para cada uno de los nidos por separado y por muestreo, para evitar error en la definición de los morfotipos de las colonias. Pues si el material viene de una misma unidad experimental es más probable que las morfologías similares correspondan a una misma cepa

bacteriana. Se tomó esta medida teniendo en cuenta que los *Streptomyces* son organismos morfológicamente complejos que difieren en estructura en diferentes momentos de su ciclo de vida (Panda y Rameshaiah, 2009). A cada morfotipo se le asigno un código compuesto por la inicial de la zona ecológica (H) para el bosque húmedo, (S) bosque seco y (M) manglar, seguido por las iniciales de la especie (Nc) *N. costalis* y (Na) *N. acajutlae,* el muestreo (P) para el primero y (S) para el segundo y por último un guion seguido del numero de aislamiento. Ejemplo: HNcP-1.

Tabla 1. Ubicación GPS de los nidos muestreados de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda).

Nido	Bosque seco Guánica	Manglar Joyuda	Bosque Húmedo Mayagüez
1	17° 57.218N 066° 54. Elevación 20 ft	18° 06.236N 067° 10.893W Elevación 31 ft	18° 12.745N 067° 08.322W Elevación 160ft
2	17° 56.976N 066° 53.9(Elevación 0 ft	18° 07.125N 067° 10.990W Elevación 31 ft	18° 12.786N 067° 08.286W Elevación 179 ft
3	17° 57.261N 066° 50.91 Elevación 4ft	18° 01.667N 067° 10.553W Elevación 33ft	18° 12.781N 067° 08.266W Elevación 209 ft

2.4. Identificación Macroscópica y Microscópica de las Cepas de *Streptomyces* Aisladas de los Nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae*

2.4.1. Caracterización Macroscópica

Se observó el crecimiento de las colonias del género *Streptomyces* sobre la superficie de YMEA (Yeast Malt Extract Agar) aproximadamente 5 días después de ser inoculadas e incubadas a 25°C; se tuvo en cuenta color, forma, elevación y margen.

2.4.2. Caracterización Microscópica

Las cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis y Nasutitermes acajutlae* fueron sembradas en medio YMEA (Yeast Malt Extract Agar) y se les introdujo un cubre objetos estéril con una inclinación de 45° grados con respecto a la superficie del agar (Figura 2), se incubaron a 25°C durante 5 días aproximadamente. Posteriormente cuando crecieron filamentos con esporas sobre los cubre objetos, se colocaron sobre una laminilla, se tiñeron con cristal violeta y fueron observados al microscopio de luz (Olympus Modelo CX41RF).

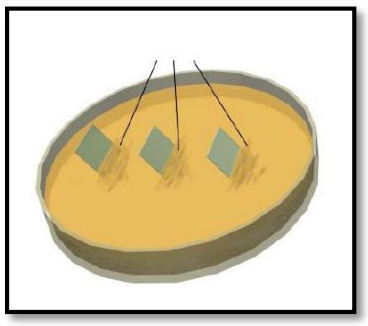


Figura 2. Esquema del método utilizado para determinar la morfología microscópica de las cepas de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda).

2.5. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de Cafaro et al., (2011) con modificaciones. Se agregaron 150 µL de lisozima para romper la pared celular se sometió a congelamiento con nitrógeno líquido y calentamiento a 65 °C. La precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol se realizó colocando las muestras a -80 °C durante 30 minutos para acelerar el procedimiento y el sedimento de ADN soló se lavó una vez con 100 µL de etanol al 70%.

2.6. Caracterización Molecular de las Cepas de *Streptomyces* Aisladas de los nidos de *Nasutitermes*

2.6.1. Técnica BOX-PCR

El método de BOX-PCR facilita la clasificación de bacterias más allá del nivel de especies, mediante la creación de un perfil de impresiones genómicas resultantes de la amplificación de regiones de ADN a partir de la ubicación de secuencias intergénicas repetitivas conocidas como los elementos box (Healy et al., 2005). Estos consisten de las subunidades diferencialmente conservadas: boxA, boxB y boxC con longitudes moleculares de 59, 45, 50 nucleótidos, respectivamente (Olive y Bean, 1999; Lynch, 1988). La caracterización de las bacterias se realizó utilizando el iniciador BOXA1R (CTACGGCAA GGCGACGCTGACG) el cual es específico para el elemento boxA, que suele encontrarse en orientaciones invertidas permitiendo la amplificación de ADN genómico con un solo iniciador. A partir de la separación electroforética de los productos de amplificación (Olive y Bean, 1999) se establece un patrón de bandas correspondiente a la ubicación y orientación de los elementos boxA con un alto grado de especificidad, discriminación y reproducibilidad (Healy et al., 2005).

Se usó el protocolo descrito por Lanoot et al., (2004). El ADN se utilizó a una concentración de 50 ng por reacción de PCR, la cual fue medida con un espectrofotómetro (Biophotometer plus Eppendorf), la Tabla 2 muestra la receta que se utilizó para la reacción de PCR (Volumen de reacción 25 µL).

Tabla 2. Concentración de los reactivos para reacción de PCR

Reactivo	**Cantidad µL**
H_2O destilada desionizada	12.65
5X amortiguador	5
10 mg ml^{-1},BSA	0.4
2,5 mM dNTP's	1.25
DMSO 99.7%	2.5
1.25 u TaQ	0.2
DNA	50ng-(2µL)
Cebador BOX 2p (mol)	1
Total de la reacción	= 25 µL

La programación del PCR se realizó en un termociclador BIORAD (Modelo My cycler Thermal cycler) como se indica a continuación: 95°C 7 min, 30 ciclos de 90 °C 30s -53 °C 1 min - 65 °C de 8 min, 65 °C 16 min. Los geles se prepararon con un contenido de 2% de agarosa, cargando un marcador con bandas de tamaño escalonado de 1Kb y 100pb cada seis muestras (Kapa Universal Ladder). La corrida se realizó a 60 voltios en TE 1X por 3 horas y media. Las geles fueron teñidas en TE 1X con bromuro de etidio a 0.1% durante 2 min y luego se destiñeron 30 min en agua destilada (para este análisis se seleccionaron 482 cepas que fueron los que mostraron mayor número de morfotipos aislados).

2.6.2. Identificación Molecular

A partir de los patrones de bandas obtenidos con la técnica BOX-PCR se realizó una matriz de presencia ausencia y con ayuda del programa PAST (Software estadístico) y el algoritmo Neighbor-Joining y el modelo Jukes-Cantor se realizó un dendrograma.

2.6.3. Amplificación del Gen 16S Ribosomal

Se escogieron 177 cepas distribuidas en cada uno de los grupos formados en el dendrograma realizado con el análisis de BOX-PCR descripto en el ítem anterior. La amplificación del gen 16S ribosomal se llevó a cabo usando una concentración de 50 ng de ADN que fue medida con un espectrofotómetro (Biophotometer plus, Eppendorf). La receta que se utilizó para el PCR con un volumen de reacción 25 µL fue: amortiguador de PCR 5X, MgCl2 2.5 nm, 0,3 mM de cada cebador 0,16 mM dNTPs y 5 unidades de Taq polimerasa. Parámetros utilizados en termociclador BIORAD (Modelo My cycler Thermal cycler) fueron: 95 ° C 3 min, 95 ° C 45 min, 52 ° C 45 min, 72 ° C 3 min y 72 ° C 7 min durante 30 ciclos. Se utilizaron los cebadores universales bacterianos (Carril, 1991; Weisburg et al., 1991) 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3 ') y 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3') para el gen 16S ribosomal. Se realizó un control negativo que consistió en efectuar una reacción de PCR sin muestra de ADN, al no obtenerse producto amplificado, se valido que los reactivos no mostraban contaminación.

2.6.4. Secuenciación del Gen 16S Ribosomal

Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis y fueron enviados para ser secuenciados por la Unidad Genómica de Alto Rendimiento de la Universidad de Washington, Seattle, WA. Las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher 4.3.

2.6.5. Análisis de Secuencias

Las secuencias se analizaron contra la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) en GenBank para determinar el porcentaje de similitud con las especies y cepas ya disponibles en la base de

datos. El alineamiento y el análisis filogenético se realizaron Neighbor-Joining y el modelo de Jukes-Cantor, utilizando el programa Mega 5 (Tamura et al., 2011).

2.7. Degradación de Celulosa

Se realizó la determinación cualitativa de la actividad celulolítica de las cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* (se seleccionaron 404 cepas representantes de cada grupo establecido con el dendrograma realizado a partir de los patrones de banda obtenidos con la técnica de BOX-PCR). Las cepas fueron inoculadas en un medio de cultivo basal (este medio tiene una composición mínima de sales y minerales junto a un hidrato de carbono, para estudiar la capacidad que tienen las bacterias para utilizarlo) que contenía como única fuente de carbono celulosa microcristalina en polvo. Se utilizaron platos petri cuadrados colocando 6 cepas por plato; adicional a eso se realizó una réplica en un plato petri diferente; fueron inoculadas a 25°C. A los 5 días de haberse sembrado, se le adicionó 5 mL de yodo con una pipeta serológica procurando cubrir todo el plato y se dejo actuar alrededor de 10 minutos. El yodo forma un complejo de color negro con la celulosa y no con la celulosa hidrolizada mostrando una zona clara alrededor de las colonias degradadoras de celulosa (Kasana et al., 2008; Dashtban et al., 2010).

2.8. Análisis Químico del Material del Nido

Se realizaron análisis químicos para determinar los nutrientes en el nido y saber si existen diferencias en la composición según la especie de termita o el hábitat. Los análisis que se le realizaron al material de los nidos son generalmente utilizados para determinar nutrientes en muestras de suelo. El material de los nidos fue previamente macerado y pulverizado en matraces individuales para cada muestra.

2.8.1. Determinación N-$NH4^+$ y $–NO3^-$

Se colocaron 10 gramos del material seco de cada uno los 9 nidos muestreados en un matraz de 250 mL, se les adicionaron 100 mL de KCl (2N) y se colocaron durante una hora en agitación. Luego se filtraron las soluciones a través de un filtro de papel Whatman # 42; finalmente las muestras fueron colocadas en un matraz de destilación a vapor con 5 gotas de aceite mineral y 2 gramos de MgO, se removió el tapón para que iniciara la destilación y se le agregaron 2 g de la aleación del metal Devarda pasado a través de una malla 400 (Tamaño de tamiz de 0.037mm). Se estandarizó NaOH (0.005N) con ftalato ácido de potasio y con esté a su vez se estandarizó el H_2SO_4 (0.005N). Se destilaron 30 mL de cada muestra en un matraz de 50 mL que contenían 5 mL de acido bórico al 2% con un indicador mixto (Bromocresol verde/ Rojo de metilo). La titulación para la determinación del *N-$NH4^+$ y $–NO3^-$* se realizó con H_2SO_4 (0.005) estandarizado específicamente para cada uno (Sparks, 2007; Jones, 2001).

2.8.2. Determinación del Fósforo

Para la determinación del fósforo se utilizó el método de Bray II para las muestras con pH $\leq$ 7.30 y el método de Olsen para las muestras pH $\geq$ 7.30. Se colocó 5 gramos de cada muestra de nido seco en un matraz, y según el pH se le adicionó la solución correspondiente del método Bray II (Bray y Kurtz, 1945) o el método Olsen (Olsen y Dean, 1965). Las soluciones fueron colocadas en agitación durante 30 minutos y posteriormente se filtraron a través de un filtro de papel Whatman #42. Luego se midió la concentración de fósforo del filtrado en partes por millón (ppm) con espectroscopia de plasma ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) modelo 7300 DV Perkin Elmer (Jones, 2001).

2.8.3. Determinación de K, Ca, Mg

Se colocaron 5 gramos de cada una de las muestras de nido en matraces de 125 mL y se les adicionaron 50 mL de solución de extracción (1N $NH_4C_2H_3O_2$, pH 7). Luego se colocaron 15 minutos en agitación y se transfirieron a un nuevo matraz pasándolas a través de un filtro de papel Whatman # 42. La concentración de *K, Ca, Mg y Mn* se midió en (ppm) con espectroscopia de plasma ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) modelo 7300 DV Perkin Elmer (Sparks, 2007; Jones, 2001).

2.8.4. Determinación de Fe, Mn y Zn

Se colocaron 5 gramos de cada una de las muestras de nido en matraces de 125 mL y se les adicionaron 50 mL de solución de extracción (0.005N HCl+ 0.025N H_2SO_4). Luego fueron colocados 15 minutos en agitación. Las muestras fueron transferidas a otro matraz a través de un filtro de papel Whatman #42. La concentración de *Fe, Mn y Zn* se midió en (ppm) con espectroscopia de plasma ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) modelo 7300 DV Perkin Elmer (Sparks, 2007; Jones, 2001).

2.8.5. Determinación de Carbono Orgánico y Materia Orgánica

Se pesó 0.15 g de material de nido seco y ultrafino (partículas de diámetro 0.5 µm) de los nidos y fueron transferidos a matraces de 500 mL. En una campana extractora, se les adicionó a las muestras 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1N, cubriendo toda la muestra, luego se adicionaron 20 mL de H_2SO_4 utilizando un cilindro graduado para la reacción acida que ocurre mientras se destruye la materia orgánica, al tiempo se le agitó con cuidado para que la reacción sucediera completamente. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se le adicionaron 200 mL de agua destilada y tres gotas del indicador ferroína. La valoración de las muestras se realizó con

Fe $(NH_4)_2SO_46H_2O$ 0.2N estandarizado para la determinación de carbono orgánico y materia orgánica. Las soluciones fueron valoradas en soluciones blancas para la normalización del Fe $(NH_4)_2SO_46H_2O$ 0.2N (Sparks, 2007; Jones, 2001).

2.8.6. Determinación de pH del Material del Nido en H_2O

Se tomaron 20 gramos del material seco de cada uno los 9 nidos muestreados; 3 por cada zona ecológica. El nido 4 adicional, procedente del manglar, no fue incluido en el análisis porque no fue posible obtener material suficiente para este fin. Se les adicionó 40 mL de agua destilada, luego se colocaron en un agitador mecánico durante 15 minutos. El medidor de pH fue calibrado con 2 soluciones amortiguadoras de 7 y 4 pH. Para tomar el pH las muestras fueron agitadas y se esperó 5 minutos para estabilizar la muestra antes de tomar la medida (Sparks, 2007; Jones, 2001). Con los datos de la composición del nido se realizó un análisis de componentes principales con el programa estadístico PAST.

2.9. Fotografía Electrónica de Barrido del Material del Nido de *Nasutitermes costalis*

Se tomó una muestra de un nido del bosque húmedo que pertenecía a la especie *Nasutitermes costalis.* La muestra fue deshidratada en un baño de alcohol, empezando en un 10% de alcohol y subiendo el porcentaje de 10 en 10 hasta llegar a un 100% para eliminar completamente el agua de la muestra. Luego fue llevada al centro de microscopía ubicado en el Departamento de Biología en la Universidad de Puerto Rico - Recinto de Mayagüez para análisis bajo el microscopio electrónico de barrido.

2.10. Análisis Estadístico

2.10.1. Análisis Estadístico para Caracterización Macroscópica

Para comparar la diversidad de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en las tres zonas ecológicas de Puerto Rico, se realizaron pruebas de normalidad con el test de Shapiro-Wilks y se realizó un análisis no paramétrico con el test Kruskal-Wallis. Adicional a eso, se determinó la abundancia de los morfotipos en cada nido a partir de establecer la frecuencia sobre el total de morfotipos por nido (frecuencia relativa).

2.10.2. Análisis Estadístico para la comunidad de *Streptomyces* a partir de BOX-PCR

A los grupos formados en el dendrograma realizado con los patrones de banda obtenidos con la técnica de BOX-PCR; se le realizaron análisis de índices de diversidad con el programa estadístico PAST; usando como variable el ambiente de donde fue aislada la bacteria y la especie del nido de la termita.

2.10.3. Análisis Estadístico para Material del Nido

Se realizaron pruebas de normalidad con el test de Shapiro-Wilks y se realizó un análisis no paramétrico con el test Kruskal-Wallis. También se realizó un análisis de componentes principales para los micronutrientes del nido con el programa estadístico PAST.

3. Resultados

3.1. Identificación de la Especie de termita para Cada Nido Muestreado

A partir de la identificación de los soldados de termitas (Figura 3); se determinó que los nidos del bosque húmedo junto con los nidos del manglar correspondieron a la especie *N. costalis.*

Mientras que los nidos del bosque seco junto con el nido adicional del manglar pertenecieron a la especie *N. acajutlae.*

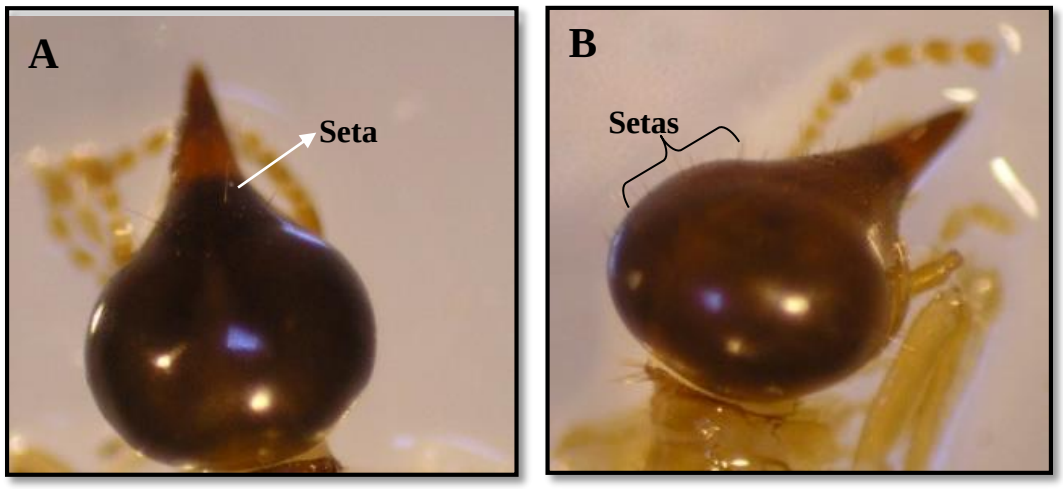


Figura 3. Cabezas de soldados de las dos especies de termitas utilizadas en esta investigación, a partir de las cuales se realizó la identificación respectiva de la especie. (**A)** *Nasutitermes costalis* Cabeza con seis setas uniformemente espaciadas. **(B)** *Nasutitermes acajutlae* cabeza cubierta con docena de sectas erectas.

3.2. Colonias Aisladas de los Nidos de *Nasutitermes*

Se aislaron un total de 832 colonias en el primer muestreo y 834 colonias en el segundo muestreo de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* en las tres zonas ecológicas de Puerto Rico; la Figura 4 muestra el porcentaje de colonias aisladas por nido y por zona ecológica sobre un total de 1666 colonias de ambos muestreos. Se puede observar que la mayor cantidad de colonias aisladas se obtuvo del bosque seco de Guánica con un 43%, seguido por el manglar con un 35% y por último el bosque húmedo con un 22% en donde el número de colonias aisladas fue el más bajo de las tres zonas ecológicas estudiadas.

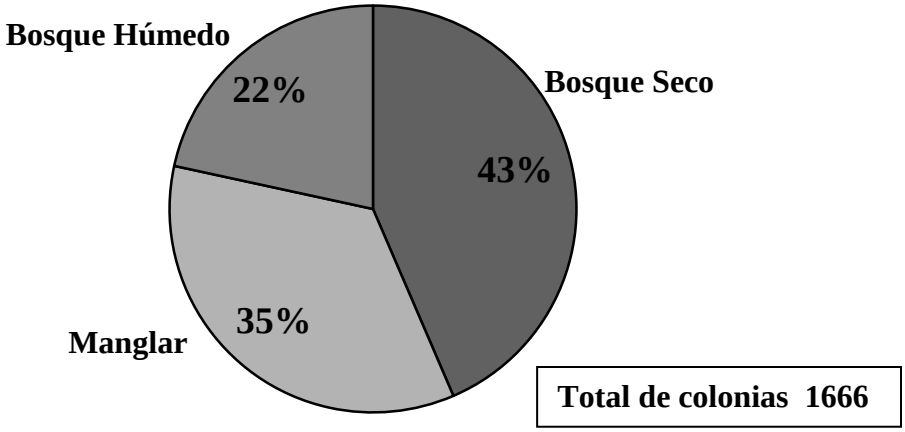


Figura 4. Porcentaje de colonias de bacterias, aisladas de 10 nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda). El total de 1666 colonias es de los dos muestreos realizados.

3.3. Caracterización Macroscópica

De las 1666 colonias de *Streptomyces* aisladas en ambos muestreos, se establecieron 603 morfotipos macroscópicamente (Apéndice 1, 2), 296 para el primer muestreo y 307 para el segundo muestreo. La Figura 5 muestra la discriminación del número de morfotipos por muestreo, nido y especie. En el segundo muestreo del bosque húmedo se obtuvo el mayor número de morfotipos aislados con un total de 66. En el análisis de varianza no se observaron diferencias significativas. Podemos concluir que el número de morfotipos de *Streptomyces* aislados de los nidos de termitas por muestreo, nido, especie o zona ecológica fue equivalente.

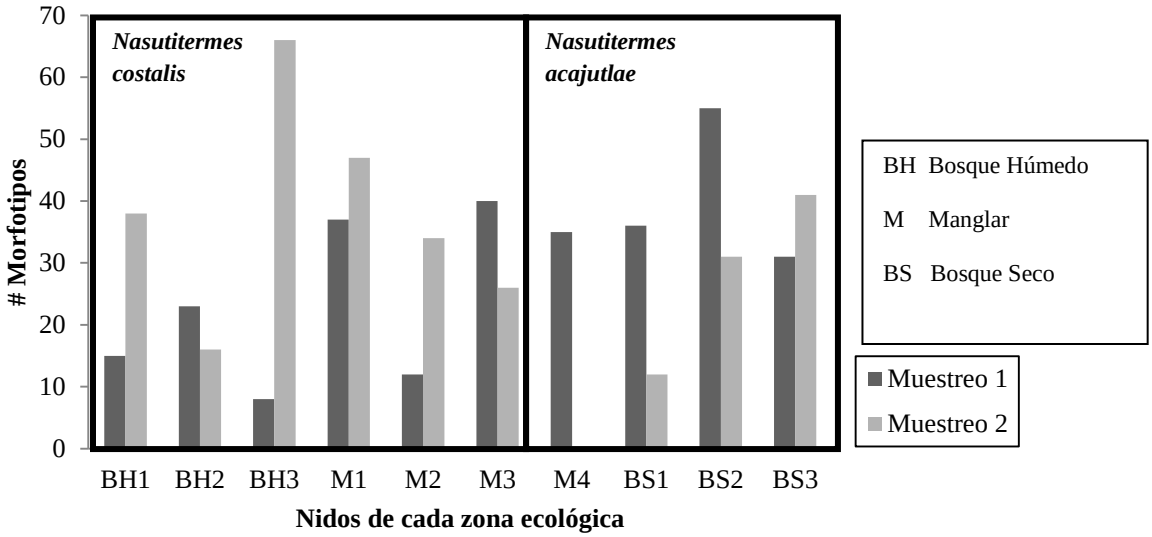


Figura 5. Morfotipos aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar). M4 es un nido adicional que se realizó en el primer muestreo en el manglar y pertenece a la especie de termita *Nasutitermes acajutlae.*

3.3.1. Abundancia de Morfotipos

Se estableció la abundancia de los morfotipos presentes en cada uno de los nidos para cada muestreo a través de determinar la frecuencia relativa con respecto al número total de colonias aisladas por nido. La Tabla 3 muestra los totales de colonias aisladas por nido, dato con que se calculo la frecuencia relativa. Las Figuras 6 y 7 muestran los morfotipos más abundantes para cada nido. El morfotipo HNcP3-521, aislado del bosque húmedo, de la especie *N. costalis,* en el primer muestreo fue el más abundante del nido 3 porque mostró una frecuencia relativa del 70% mientras que los otros morfotipos más abundantes o con frecuencias relativas altas de este muestreo estuvieron en un rango entre un 10% y un 40%. En el segundo muestreo, el morfotipo más abundante fue HNcS2-30 procedente también del bosque húmedo con una frecuencia relativa del 43% mientras que los otros morfotipos estuvieron en los rangos de 20 a 5 % de frecuencia relativa.

Tabla 3. Totales de colonias aisladas por nido, dato con que se calculo la frecuencia relativa de los morfotipos expuestos en la figura 6 y 7

Zona ecológica	Nido	Número total de colonias aisladas	
		Muestreo 1	Muestreo 2
Bosque Húmedo	1	71	209
	2	61	42
	3	60	147
Bosque Seco	1	85	18
	2	253	53
	3	49	108
Manglar	1	198	101
	2	19	49
	3	67	40
	4	93	N/A

En las Figuras 6 y 7 se incluyó la frecuencia relativa del nido 4 del manglar; pero este dato no afecta los otros porque la frecuencia fue determinada para cada nido por separado.

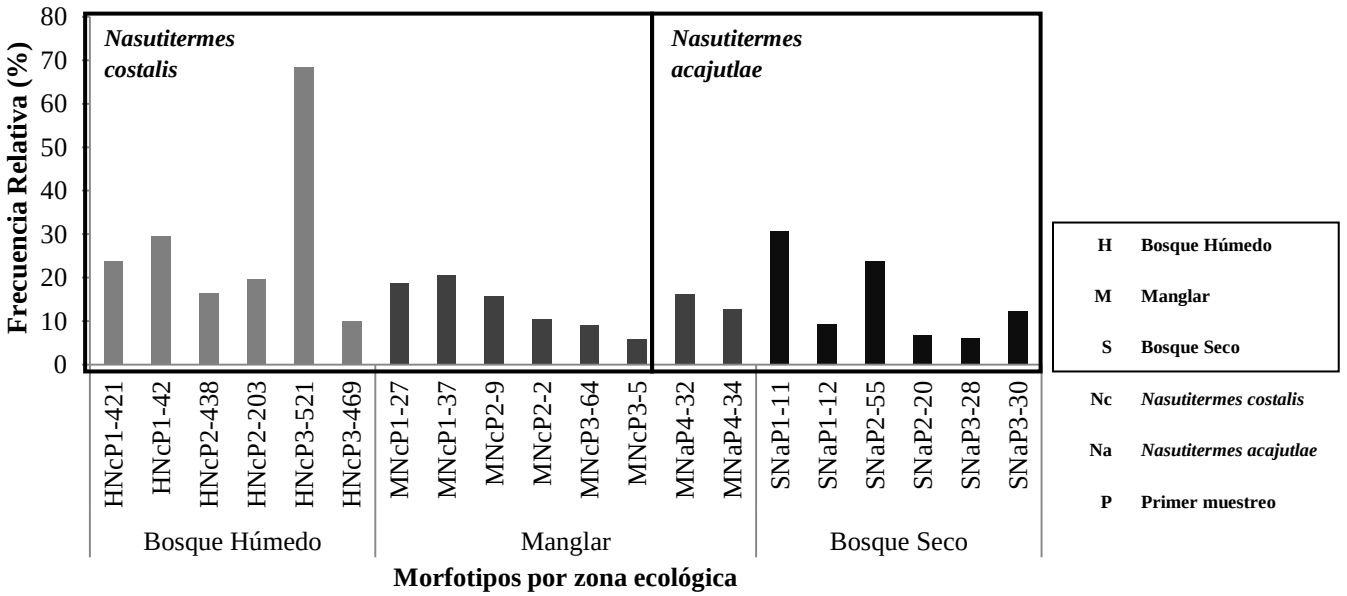


Figura 6. Frecuencia relativa de morfotipos dominantes en el primer muestreo en nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar).

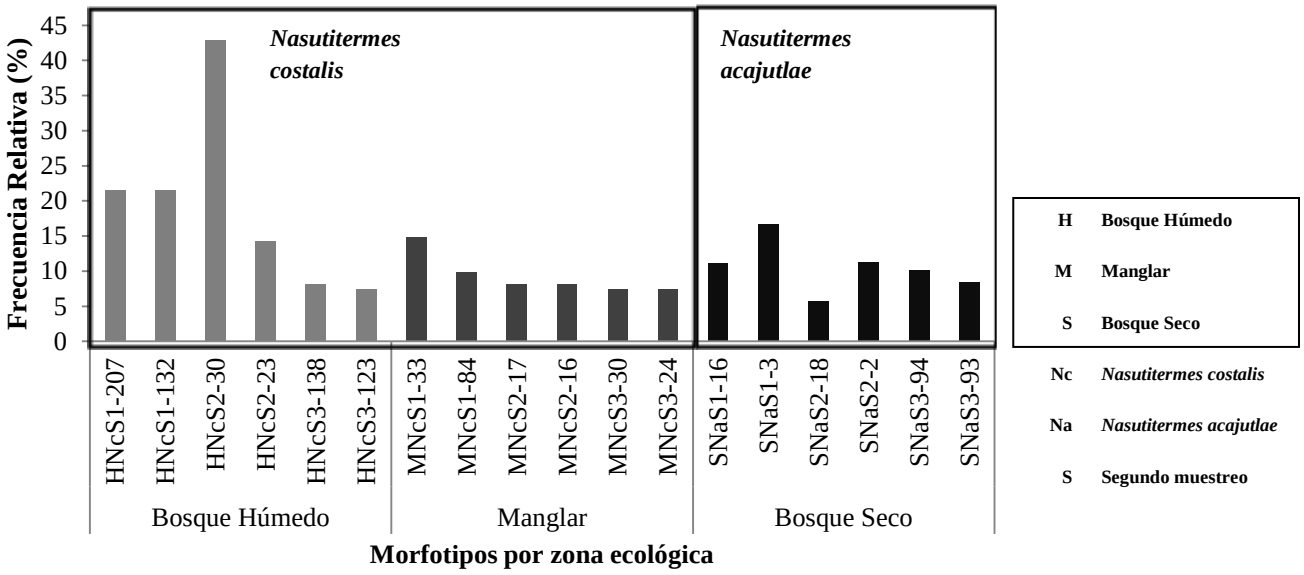


Figura 7. Frecuencia relativa de morfotipos dominantes segundo muestreo en nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo), BS (Bosque Seco) y M (Manglar).

3.4. Análisis Molecular con BOX-PCR

A partir de la técnica de BOX-PCR se amplificaron 482 cepas que fueron las que se aislaron con mayor frecuencia. Con estas cepas se realizó un dendograma para poder observar gráficamente si las cepas aisladas de los nidos de una misma especie de termita se relacionan más; o por el contrario se relacionan mejor las que fueron aisladas de nidos de una misma zona ecológica y poder dilucidar quién está aportando más a la diversidad de cepas en estos nidos. El dendrograma mostró 41 grupos; de los cuales el 57% contienen cepas aisladas de los nidos de termitas correspondientes a las tres zonas ecológicas. Aunque se esperaba que la mayoría de cepas se relacionaran a una especie de termita en particular; más de la mitad de los grupos van a estar relacionados entre ellos indiferentemente a la zona ecológica o especie de termita de donde provienen (Figura 8).

Otros pocos grupos van a relacionarse específicamente para una u otra zona ecológica, por ejemplo; un 17% agrupó cepas aisladas de los nidos provenientes exclusivamente del bosque seco y manglar; un 13% de los grupos presentó cepas aisladas de los nidos de termitas del bosque húmedo y el bosque seco y un 3% de los grupos está compuesto por cepas aisladas únicamente del bosque húmedo y manglar. Además, los grupos 10 y 18 están compuestos por cepas únicamente aisladas del manglar; los grupos 11 y 12 fueron cepas procedentes exclusivamente del bosque húmedo y el bosque seco mostró como único representante el grupo 36 (Figura 8).

También en el dendrograma se observaron grupos como el 3, 10, 11, 12, 18 con cepas aisladas únicamente de los nidos de *N. costalis*, que contenían cepas que fueron aisladas con mayor frecuencia; MNcS1-33, MNcS1-84, HNcP2-438 y HNcP2-203 (Figuras 6 y 7). Los grupos 30 y 36 presentaron cepas aisladas únicamente de nidos de *N. acajutlae* con la particularidad de que el grupo 30 presentó cepas aisladas de los nidos de *N. acajutlae* que procedían del bosque seco y del único nido del manglar que corresponde a esta especie de termita; asimismo expuso dos cepas aisladas con una frecuencia relativa más alta, MNaP4-34 (13%) y SNaP1-11 (31%) (Figura 6).

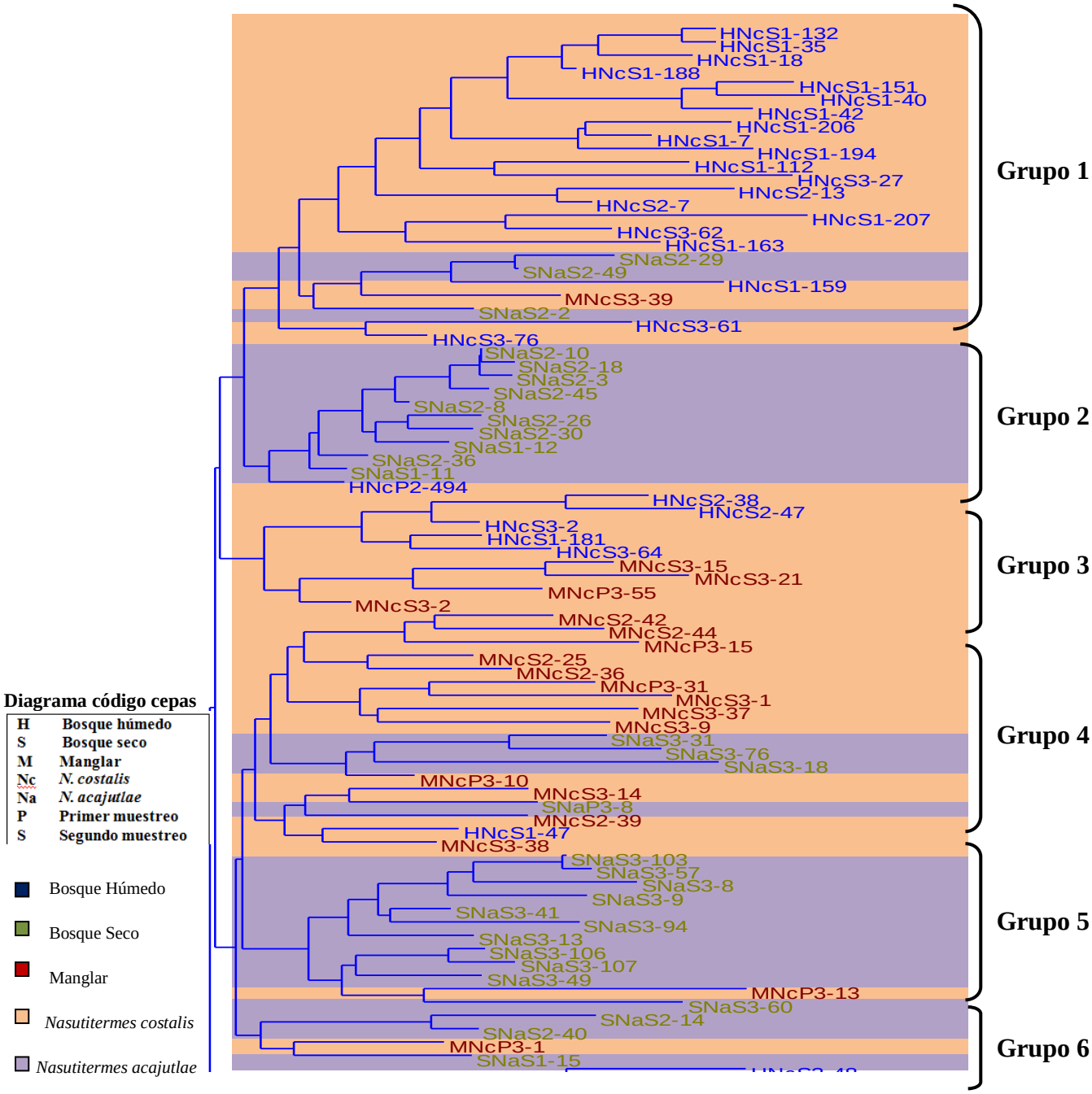


Figura 8ª. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

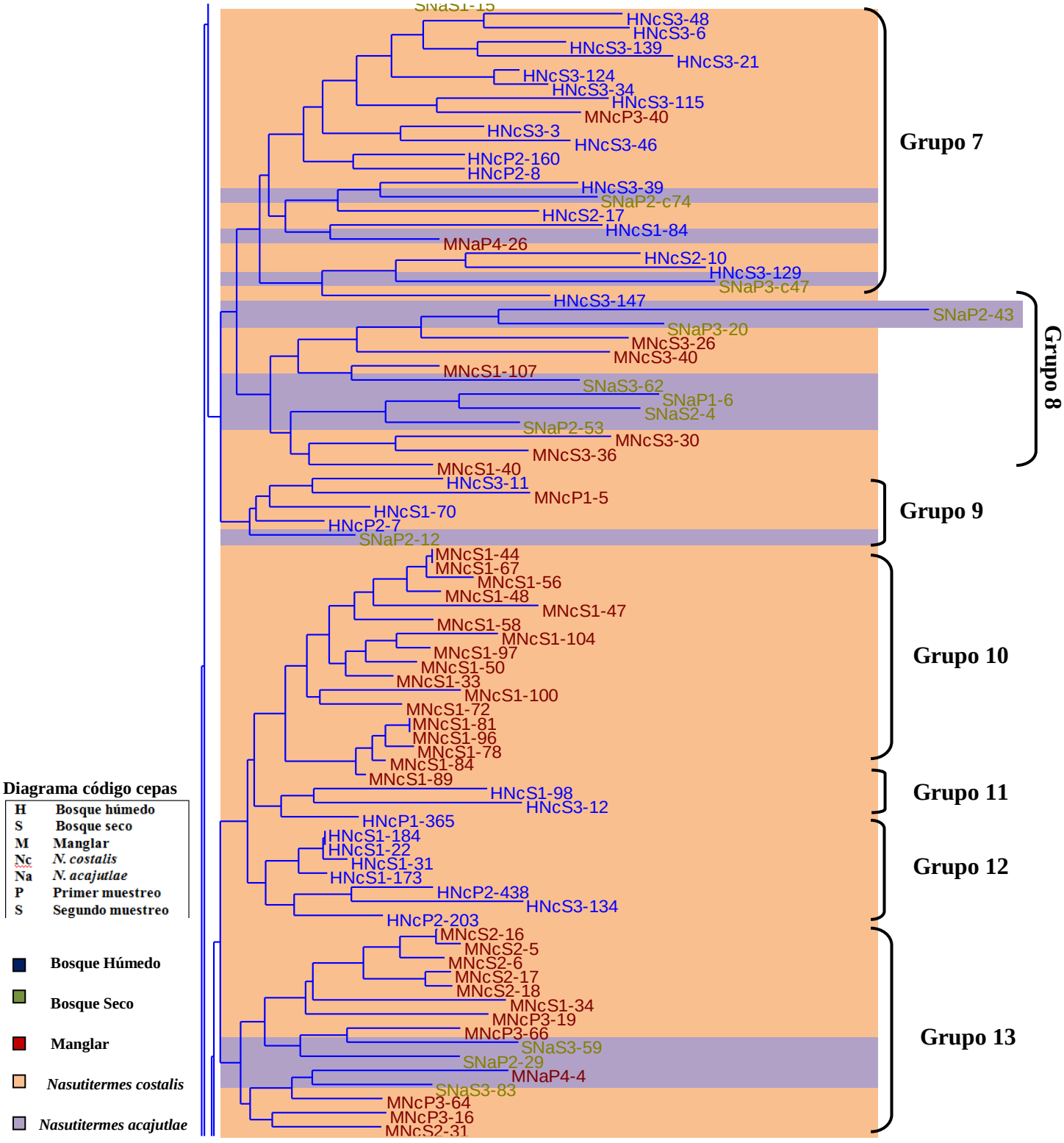


Figura 8[b]. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

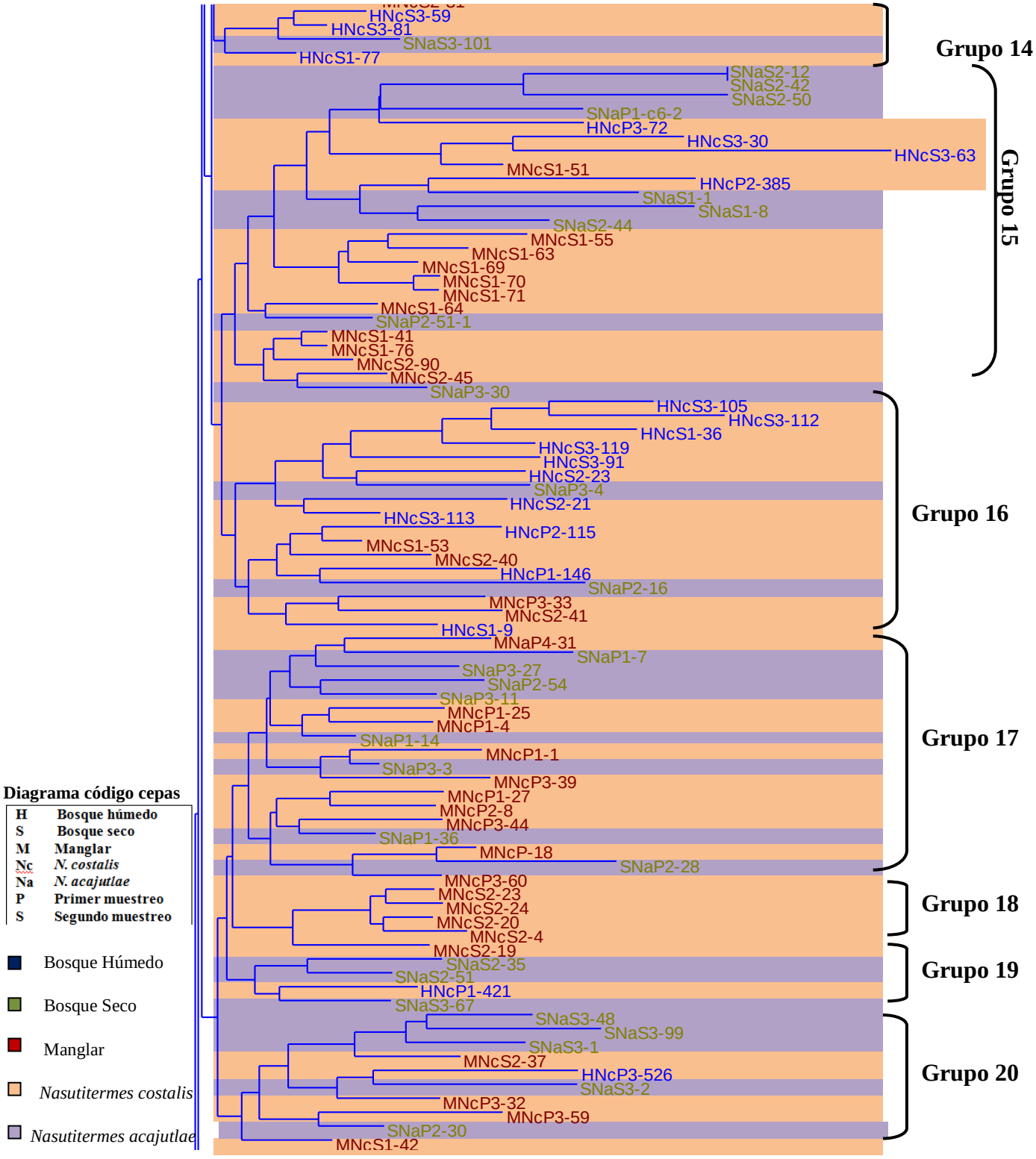


Figura 8[c]. Continua abajo. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

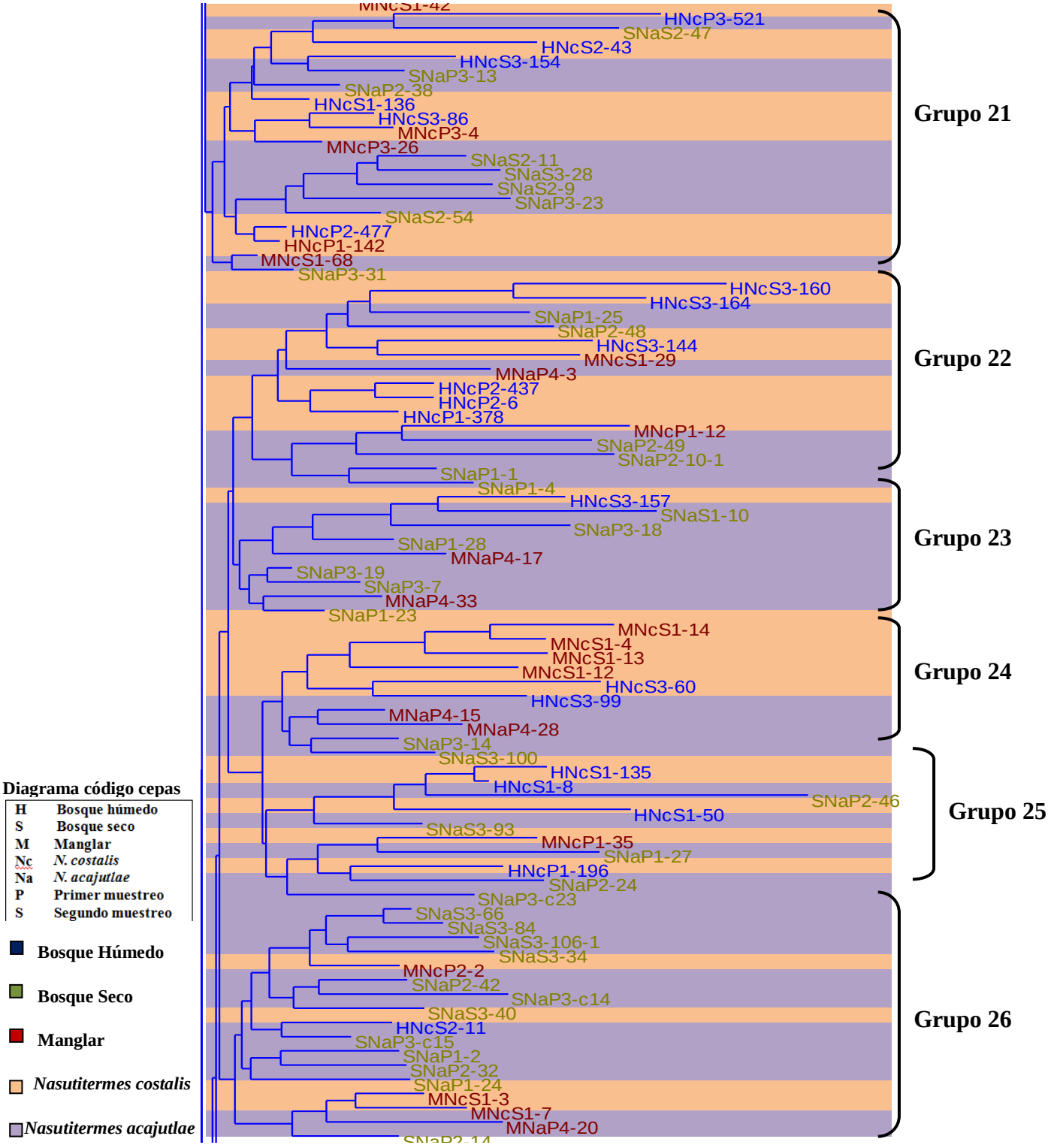


Figura 8[d]. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

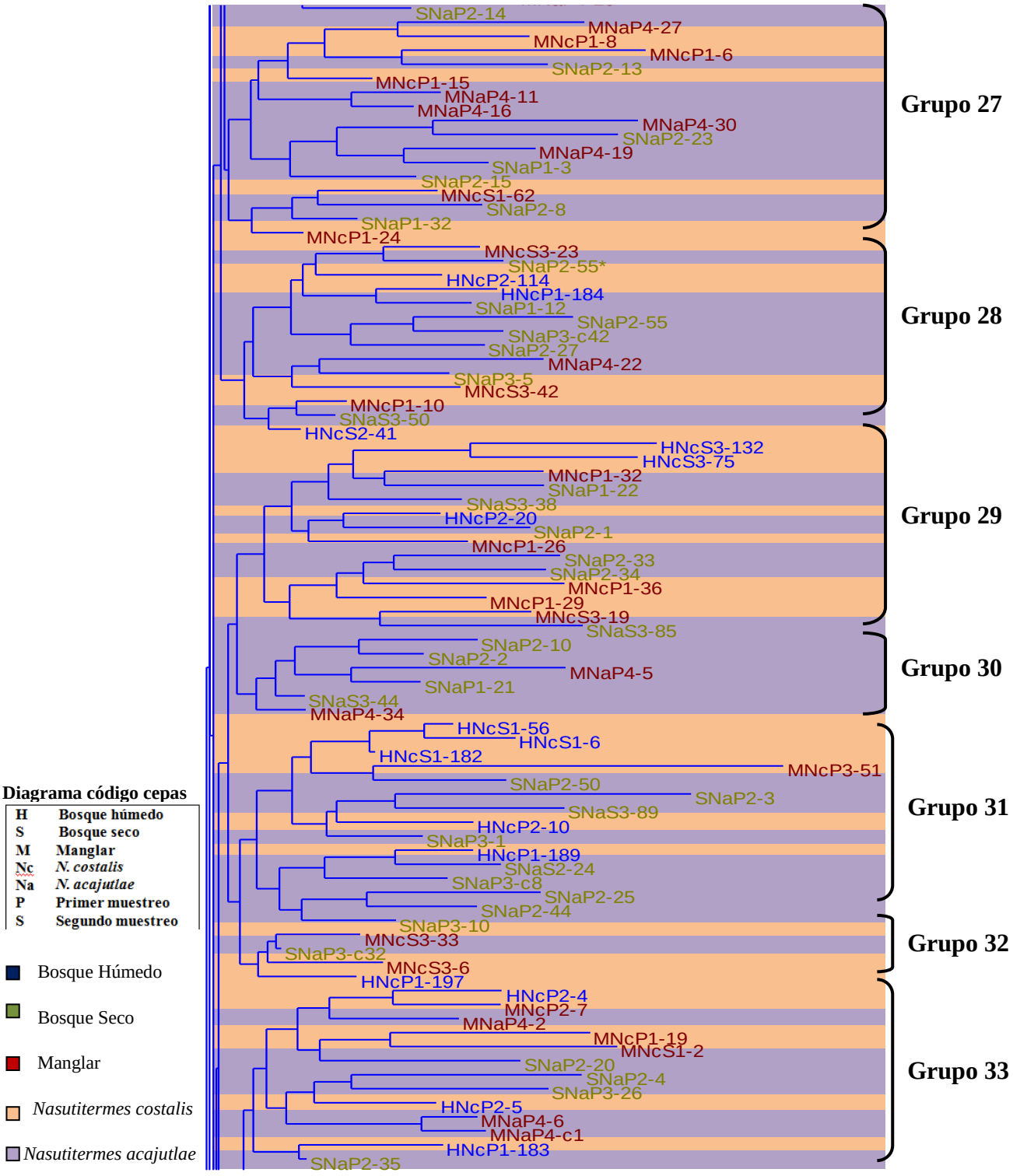


Figura 8[e]. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos *de Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

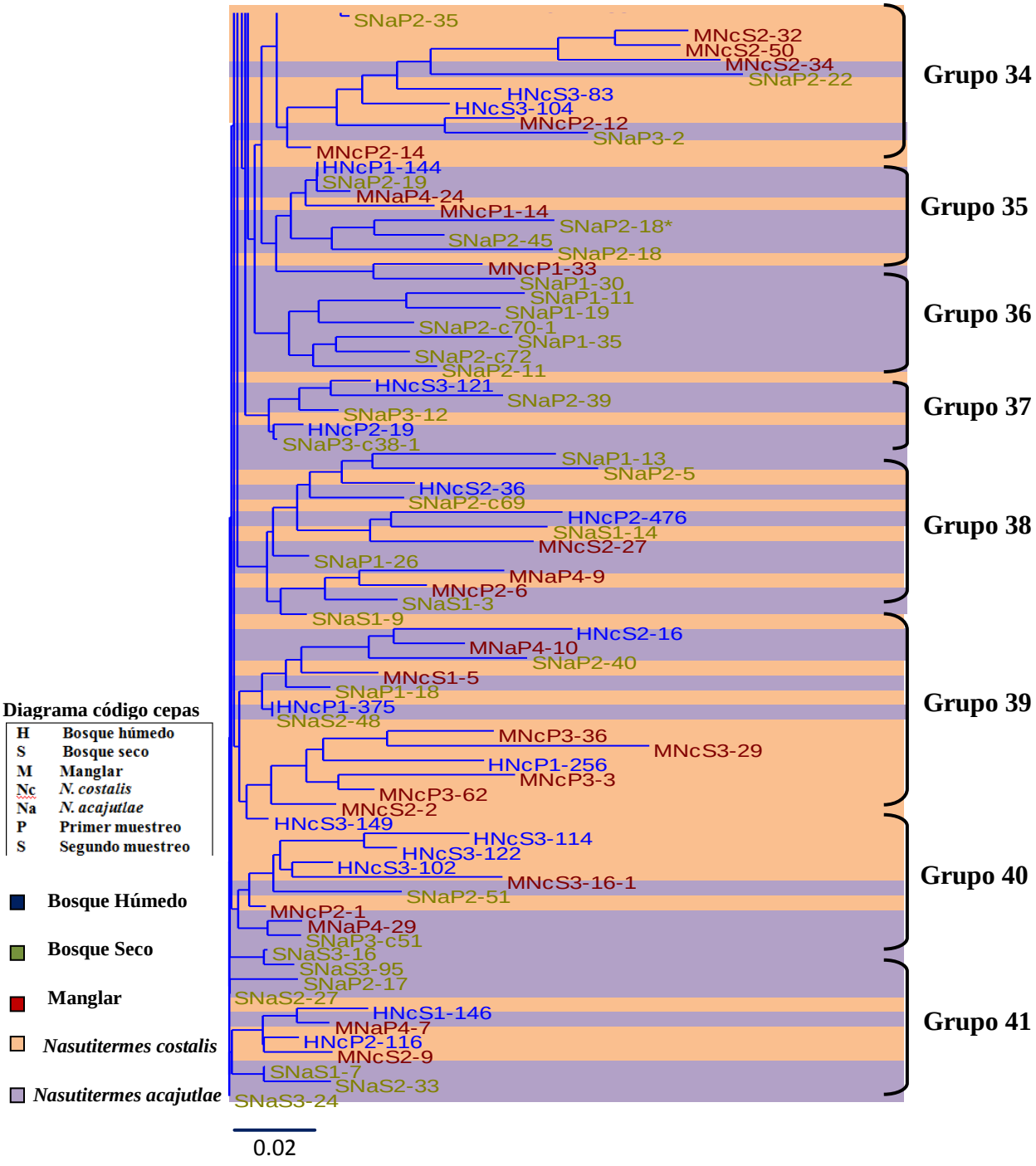


Figura 8[f]. Dendrograma de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez); Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda) a partir del patrones de bandas obtenidos con la técnica de BOX-PCR; realizado con el programa estadístico PAST.

La Figura 9 muestra como se presentaron las intercepciones entre los grupos de las cepas aisladas de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* en las tres zonas ecológicas de Puerto Rico obtenidos con la técnica de BOX-PCR.

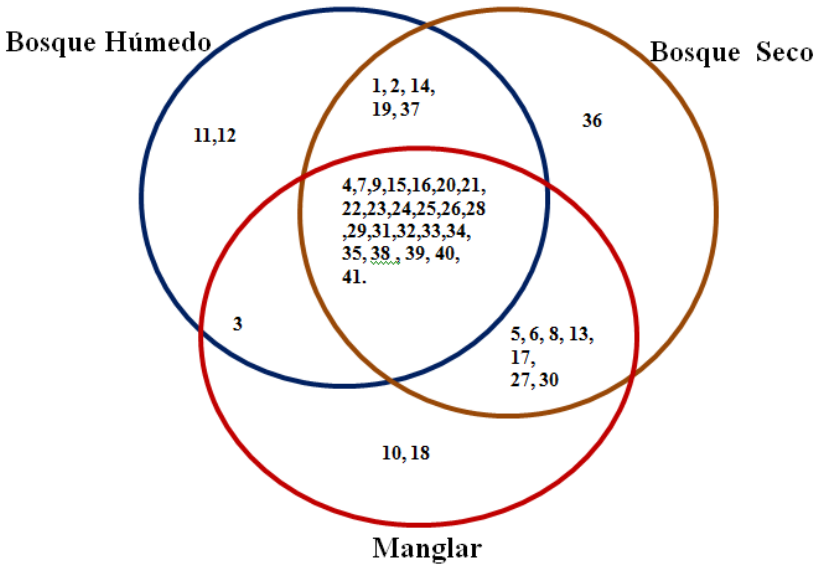
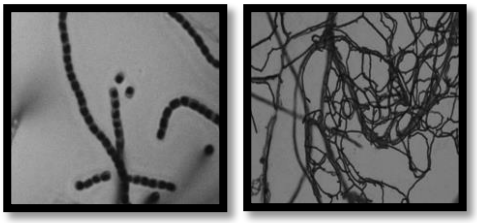
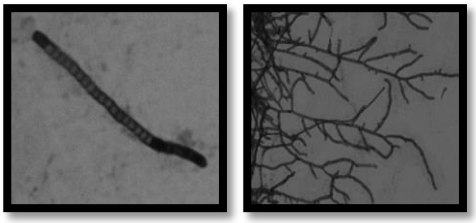
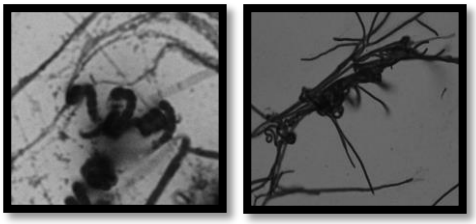
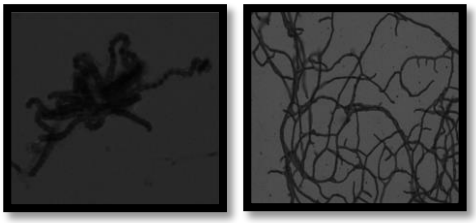
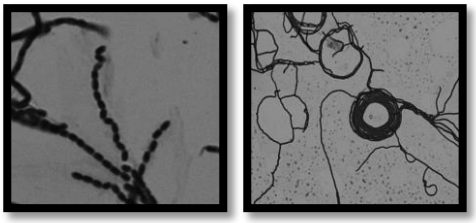
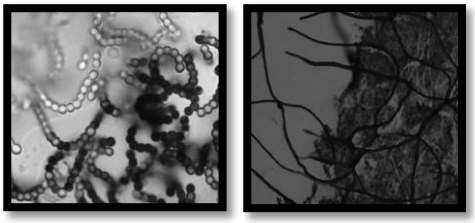


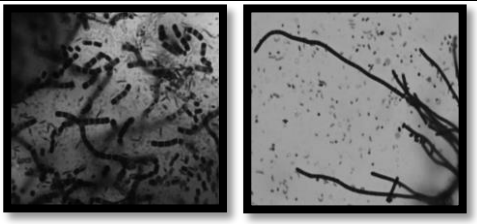
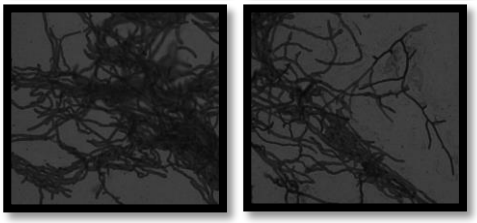
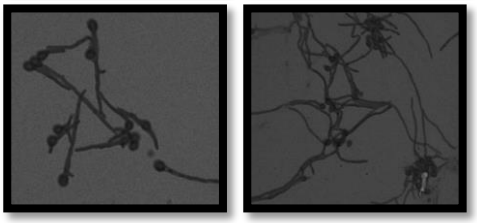
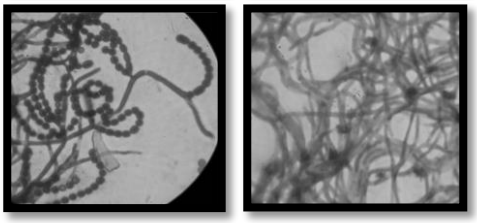
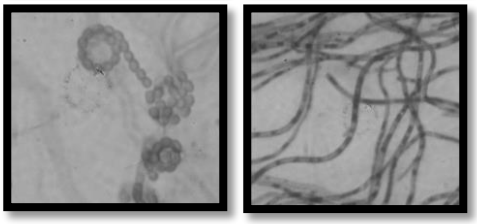
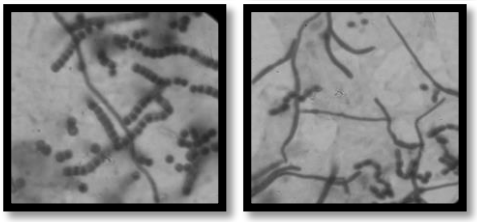
Figura 9. Diagrama de Venn que muestra los grupos formados en el dendrograma realizado a partir de el patrón de bandas de cepas de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitemes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) (Figura 8).

3.5. Caracterización Microscópica

Se seleccionaron aleatoriamente cepas representantes de cada uno de los grupos obtenidos en el dendrograma con el análisis de BOX-PCR. En total se escogieron 217 cepas y se establecieron 13 morfotipos diferentes a partir de las características de la espora y filamento de estas bacterias; en general todas las cepas a las cuales se les realizó microscopia presentaron esporas en cadena. Las diferencias en la forma de la espora y grosor de filamentos fueron ligeras. En la Tabla 4 se describen las características que presentaron los 13 morfotipos determinados microscópicamente.

Tabla 4. Clasificación de morfotipos de *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo) Mayagüez, BS (Bosque Seco) Guanica y M (Manglar) Joyuda a partir de características microscópicas, los morfotipos diferente fueron clasificados con letras. En la Tabla también se muestra fotografías de cada uno de los criterios de clasificación.

Morfotipos		**Fotografía de la Micromorfología**
Espora	**Filamento**	
A Espora redonda en cadena achatada en los extremos. Largo variable. Grosor consistente	Filamentos definidos entrelazados	
B Esporas redondas. Tamaño variable (como camándula)	Filamentos como ramificaciones arborescentes	
C Esporas en cadena en espiral bien cerrado formando un ramillete	Filamentos delgados definidos, que se enroscan hacia las puntas	
D Esporas en cadena con finales enroscados hacia dentro	Filamentos con ramificaciones muy cercanas una de la otra	
E Esporas en cadena en forma de óvalo. Alineadas	Filamentos definidos que giran en su propio eje	
F Esporas en cadena circulares gruesas, formando grandes bucles las hileras de esporas	Filamentos alargados, si ramificaciones como en forma de tridentes	

G Esporas cuadradas en cadena	Filamentos grueso y alargados, paralelos unos de otro sin ramificaciones	
H No se observaron	Forma nódulos en los filamentos	
I No se observaron	Filamento en forma de espermatozoides, nódulo en un extremo y hacia el otro lado el filamento	
J Esporas esféricas en cadenas como si se hubieran desinflado o deformadas. Filamento grueso	Filamento grueso, con diferente grosor a través de este.	
K Esporas en cadena formando un espiral	Filamento grueso sin ramificación, algunos filamentos forman rollito hacia dentro	
L Esporas en cadena redondas rellenas achatadas en los extremos	Filamentos con terminaciones en una ramificación en v, puntas gruesas	
M Esporas en cadena ovaladas terminaciones en nudo	filamento enroscados en las puntas	

La frecuencia relativa más alta para los morfotipos aislados del bosque húmedo corresponde al morfotipo (A) con un 46%, en el manglar fue el morfotipo (B) con un 17.7% y para el bosque seco el morfotipo (F) con un 22%. Todos los morfotipos estuvieron representados en cada una de las zonas ecológicas con la exención de el morfotipo (I) que se encontró únicamente en el manglar y los morfotipos (C), (K) y (M) que estuvieron ausentes en el bosque húmedo.

3.6. Análisis Filogenético a Partir del 16S Ribosomal

El árbol filogenético realizado a partir de las secuencias del 16S ribosomal resuelve 32 grupos de los cuales 24 se agruparon con secuencias de especies de *Streptomyces* previamente reportados en la base de datos. En otros 4 grupos se observó que las cepas aisladas de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* no se agruparon con ninguna secuencia conocida (Figura 10).

Debido a que el medio de quitina es semi-selectivo para *Streptomyces* también se aislaron cepas de bacterias diferentes. En el primer muestreo se aisló *Rhizobium* en el bosque seco, *Actinoplanes* en el manglar y *Amicolatopsis* en el bosque húmedo. Para el segundo muestreo se encontraron cepas de *Serratia* en el bosque seco y *Micronospora* en el manglar. Estas cepas fueron usadas en el árbol filogenético como parte del grupo externo (Figura 10).

Las cepas aisladas de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* presentaron mayor similitud filogenética entre las aisladas del bosque seco y del manglar. Es posible que como ambos ambientes son extremos compartan bacterias que presenten similares adaptaciones a la poca disponibilidad de agua. Cabe destacar que en el manglar se muestrearon nidos de las dos especies de termita.

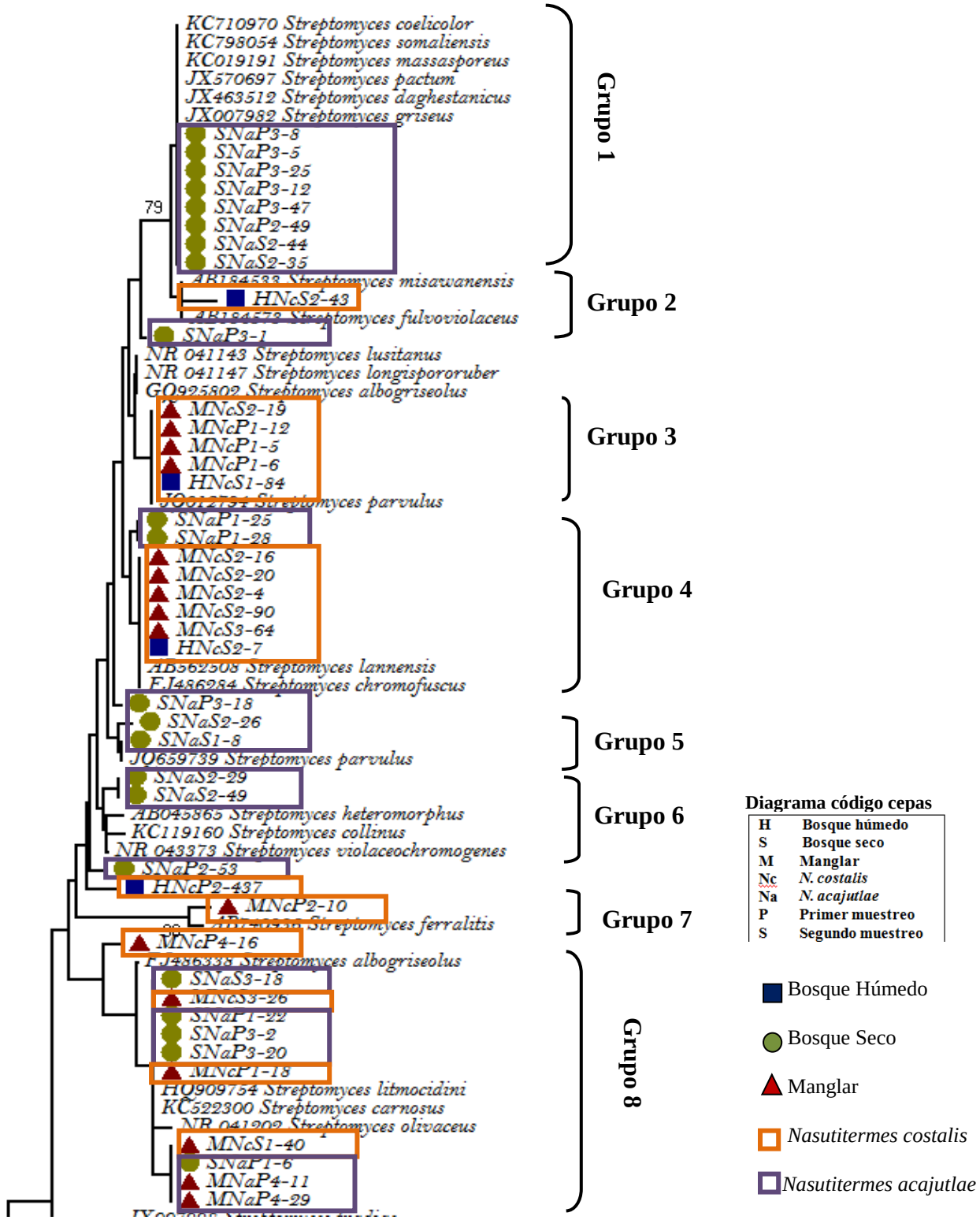


Figura 10[a]. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del Gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining.

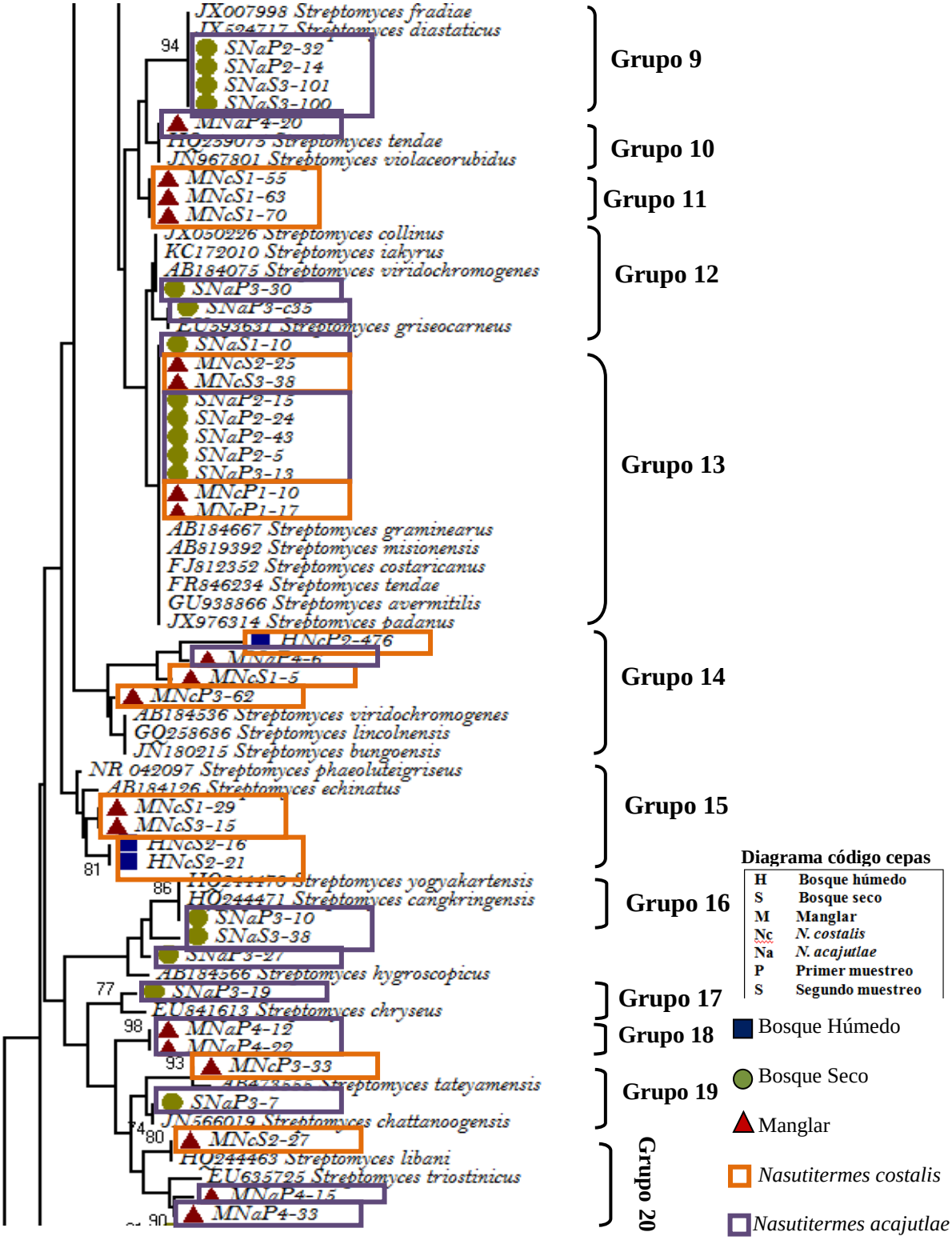


Figura 10[b]. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining.

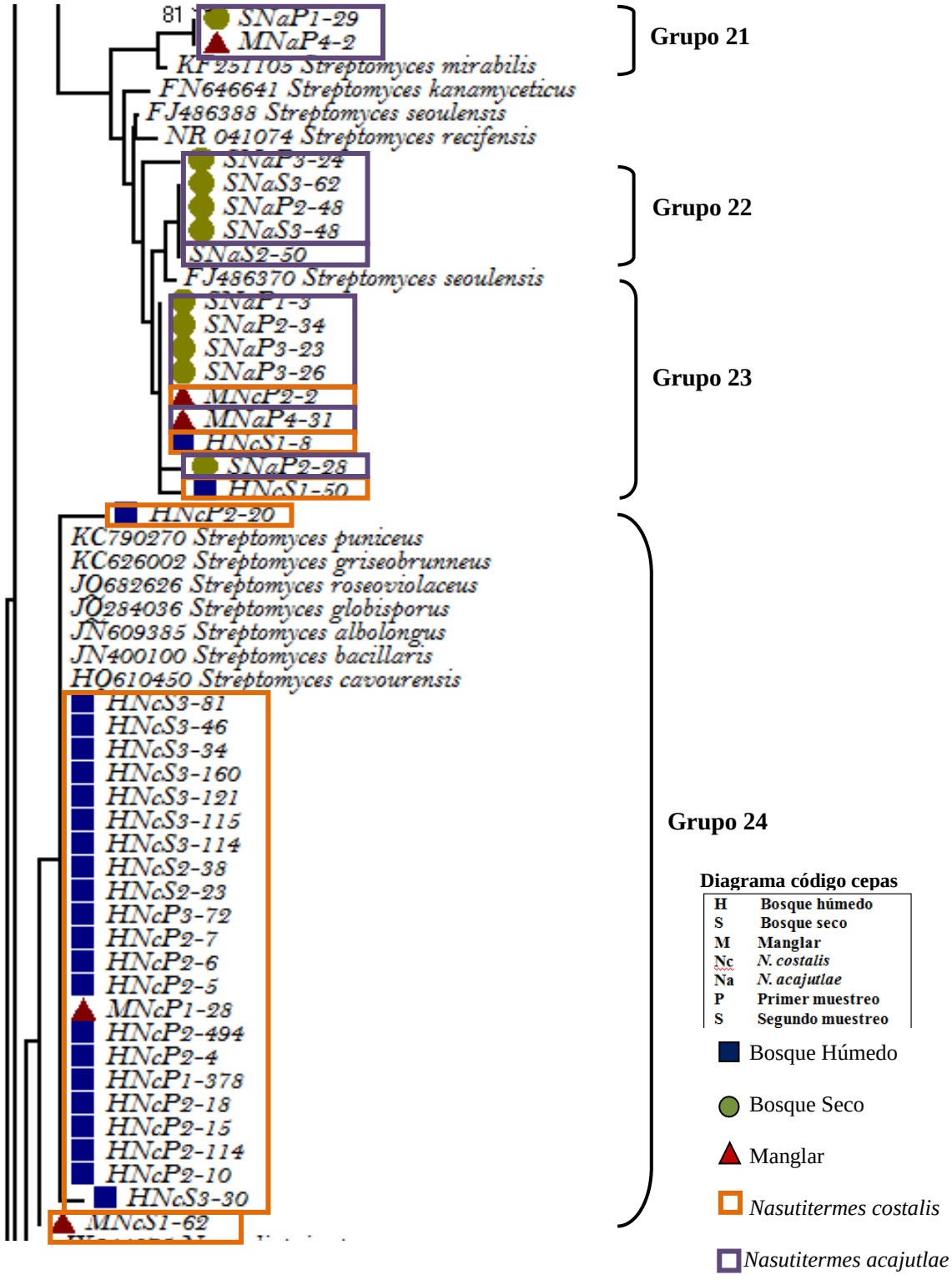


Figura 10[c]. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del Gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining.

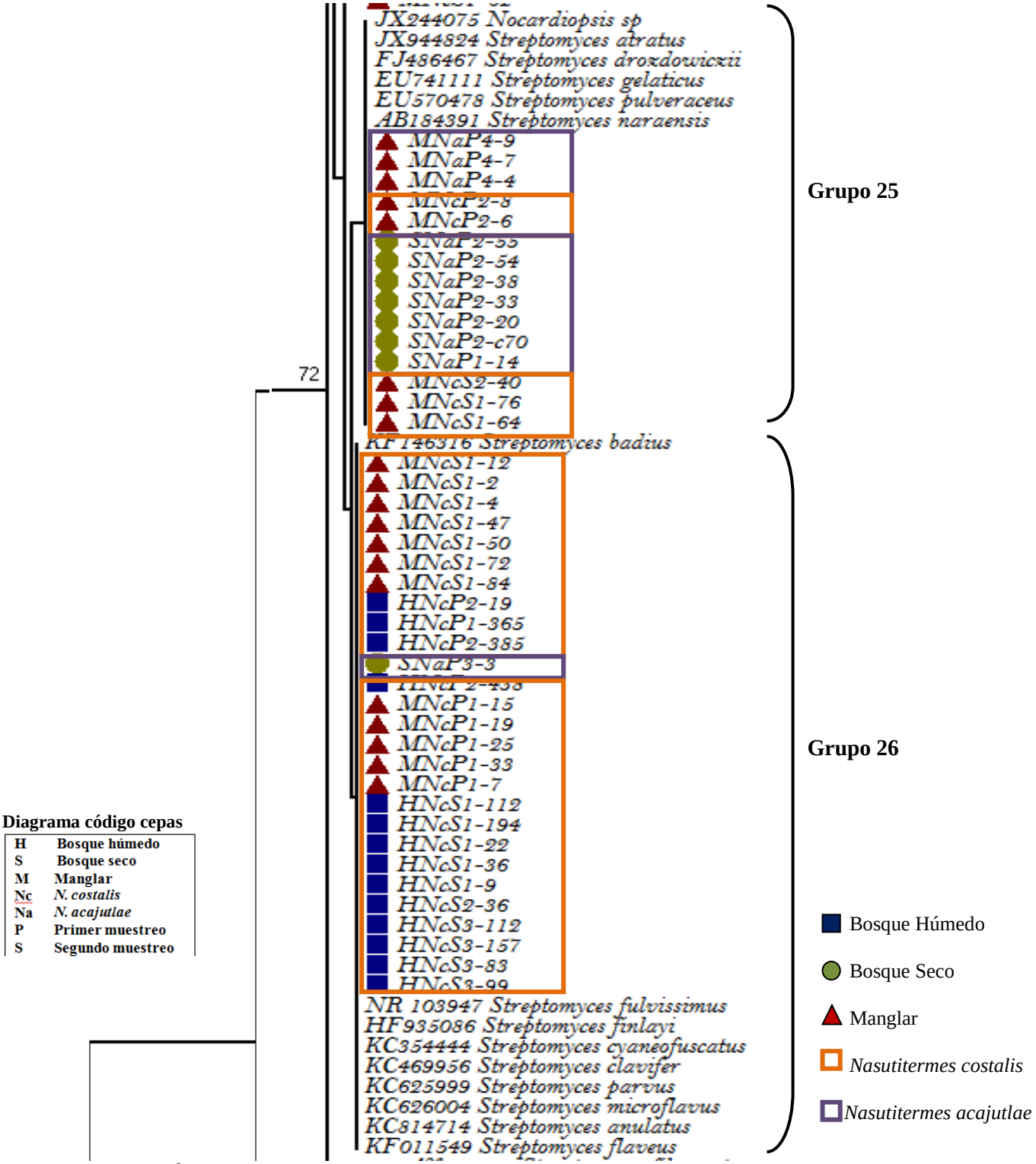


Figura 10[d]. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del Gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining.

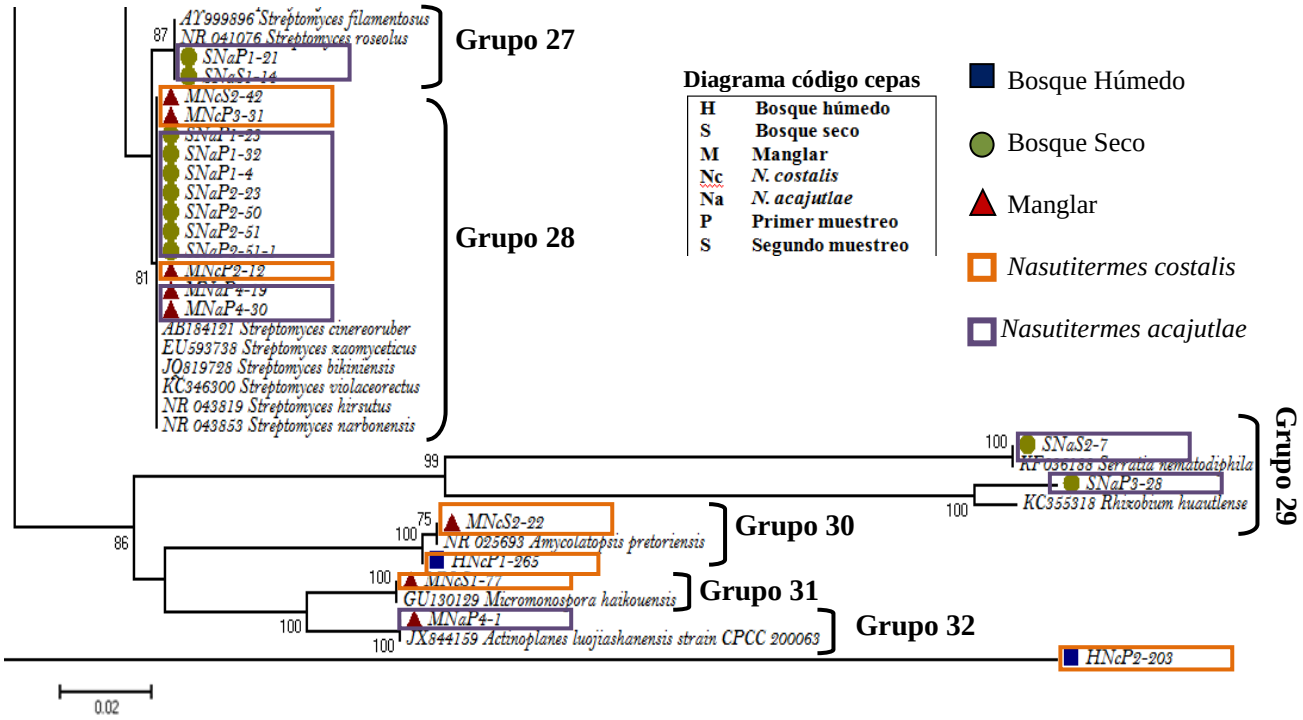


Figura 10[e]. Filogenia de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda) basado en un área parcial del gen 16S RNA; con el programa MEGA algoritmo Neighbor-Joining.

3.7. Capacidad de Degradación de Celulosa

Dado que las termitas se alimentan de celulosa y no tienen por sí solas la capacidad de degradarla, la comunidad bacteriana debe contribuir al procesamiento de este material. Se seleccionaron 404 cepas distribuidas en los grupos obtenidos en el dendrograma de BOX-PCR y se les realizó una prueba cualitativa de la capacidad degradativa de celulosa en busca de determinar un posible rol nutricional de los *Streptomyces* presentes en los nidos de termitas.

De las 204 cepas de *Streptomyces* evaluadas de los 4 nidos de *N. acajutlae*, el 97.1% tuvo la capacidad de degradar celulosa mientras que de las 200 cepas de los nidos de *N. costalis* el 96% tenía esta capacidad (Figura 11).

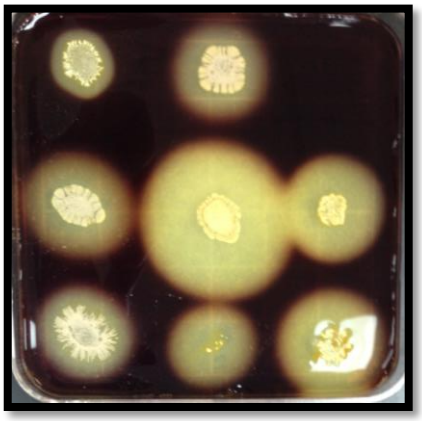


Figura 11. Prueba de celulosa a cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque húmedo (Mayagüez), Bosque seco (Guánica), Manglar (Joyuda).

3.8. Análisis Químico del Material del Nido

Los análisis de varianza de la composición del material de los nidos manifestaron que hay diferencias significativas en el contenido de Ca entre los nidos del bosque seco y del manglar con un p valor de 0.025; en el contenido de Mg se encontró diferencia significativa entre los nidos del manglar y del bosque húmedo con un p valor de 0.025; Mn con un p valor de 0.0107 presentó diferencia significativa entre nidos del manglar y del bosque seco; las cantidades de Zn con un p valor de 0.0464 tuvo diferencias significativas entre nidos del manglar y del bosque húmedo; NO_3 con un p valor 0.0429 mostró diferencias significativas entre nidos del bosque seco y del manglar (Tabla 5; figura 12). Los otros nutrientes como NH4+, P, K y Fe no mostraron diferencias significativas entre los nidos de cada zona ecológica. La composición de materia orgánica y carbono orgánico también fue similar para todos los nidos; entre 17 a 23 % en O.C. y 30 a 39 % O.M. (Tabla 5). Estos valores son altos comparados con los de un suelo, estos porcentajes de materia orgánica se consideran adecuados para cultivar plantas.

Tabla 5. Análisis del material de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico, bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda)

Nido	NH4+ppm	NO3-pm	%O.C.	%O.M.	P g/g	K ug/g	Ca ug/g	Mg ug/g	Fe ug/g	Mn ug/g	Zn ug/g	pH
BS 1	61.2	15.3	22.63	39.02	109.6	1117.61	6063.98	533.50	0	4.82	0	6.12
BS 2	566.1	15.3	20.82	35.89	55.86	1520.61	5265.98	939.80	0	4.58	0	5.12
BS 3	206.6	15.3	20.82	35.89	83.86	1156.61	5411.98	1126.80	0	7.96	0	5.59
M 1	45.9	7.65	19.46	33.55	54.55	3928.61	5128.98	1910.80	0	10.51	4.949	8.31
M 2	22.95	15.3	17.95	30.95	24.78	3647.61	6055.98	1603.80	0	12.48	3.754	7.81
M 3	38.25	7.65	18.74	32.31	40.65	5751.61	5232.98	1706.80	0	7.57	8.608	8.04
BH 1	30.6	0	18.05	31.12	44.15	5312.61	4249.98	1072.80	0	162.60	9.447	8.37
BH 2	68.85	7.65	19.19	33.08	77.58	4407.61	3932.98	1040.80	0.91	41.81	3.364	7.48
BH 3	45.9	0	22.67	39.08	64.07	4805.61	5104.98	1450.80	0.701	18.24	2.732	7.95

BS (Bosque seco); M (Manglar) BH (Bosque húmedo)

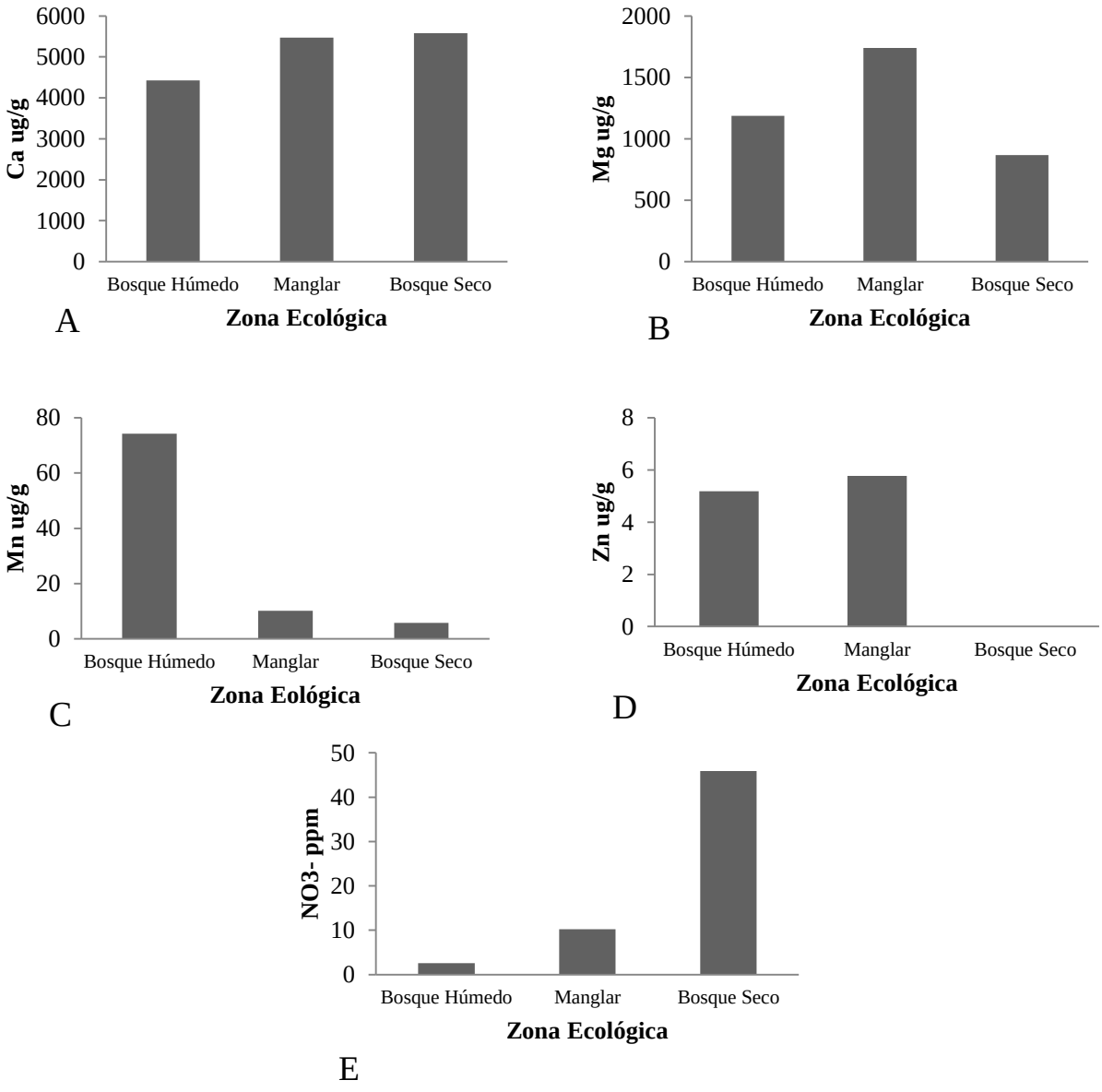


Figura 12. Elementos examinados de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico en tres zonas ecológicas de Puerto Rico, bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda) que mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico (kruskal wallis). **(A)** Ca ug/g; **(B)** Mg ug/g **(C)** Mn ug/g; **(D)** Zn ug/g **(E)** NO3- ppm.

En el análisis de composición química del nido se obtuvieron 11 variables, es posible que algunas de las variables actúen en función de otra y esto hace que la información sea redundante; por eso se realizó un análisis de principales componentes el cual determina un grupo menor de

variables fuertemente correlacionadas sin pérdida de información, que van a describir mejor los datos. Se encontró que la diversidad de los grupos obtenidos en el dendrograma de BOX-PCR; se explica por el componente principal compuesto por el $NH4^+$, P, K, Ca y el Mg; son las variables que al parecer están fuertemente correlacionadas y afectan mayormente la diversidad de *Streptomyces;* explicando juntas el 88% de la varianza (Tabla 6). Estos componentes unen los nidos de termitas provenientes del bosque seco y los separa de los nidos del manglar y el bosque húmedo; agrupando simultáneamente los nidos de *N. acajutlae* y separándolos de los de *N. costalis* (Figura 13). El K y Mg afectan los datos de forma positiva mientras que $NH4^+$, P y Ca lo hacen de forma negativa (Figura 13). El segundo componente solo mostró una varianza de 10% (Tabla 6), por esta razón no se toma en cuenta.

Tabla 6. Análisis de componentes principales correlacionando con cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX-PCR) con los elementos del material de los nidos.

Principal componente	Valor Propio	% Varianza
1	3.51E+06	87.666
2	391243	9.7833
3	83680.9	2.0925
4	16990.7	0.42487
5	1254.98	0.031382
6	86.9166	0.0021734
7	6.53113	0.00016332
8	0.0710413	1.78E-06

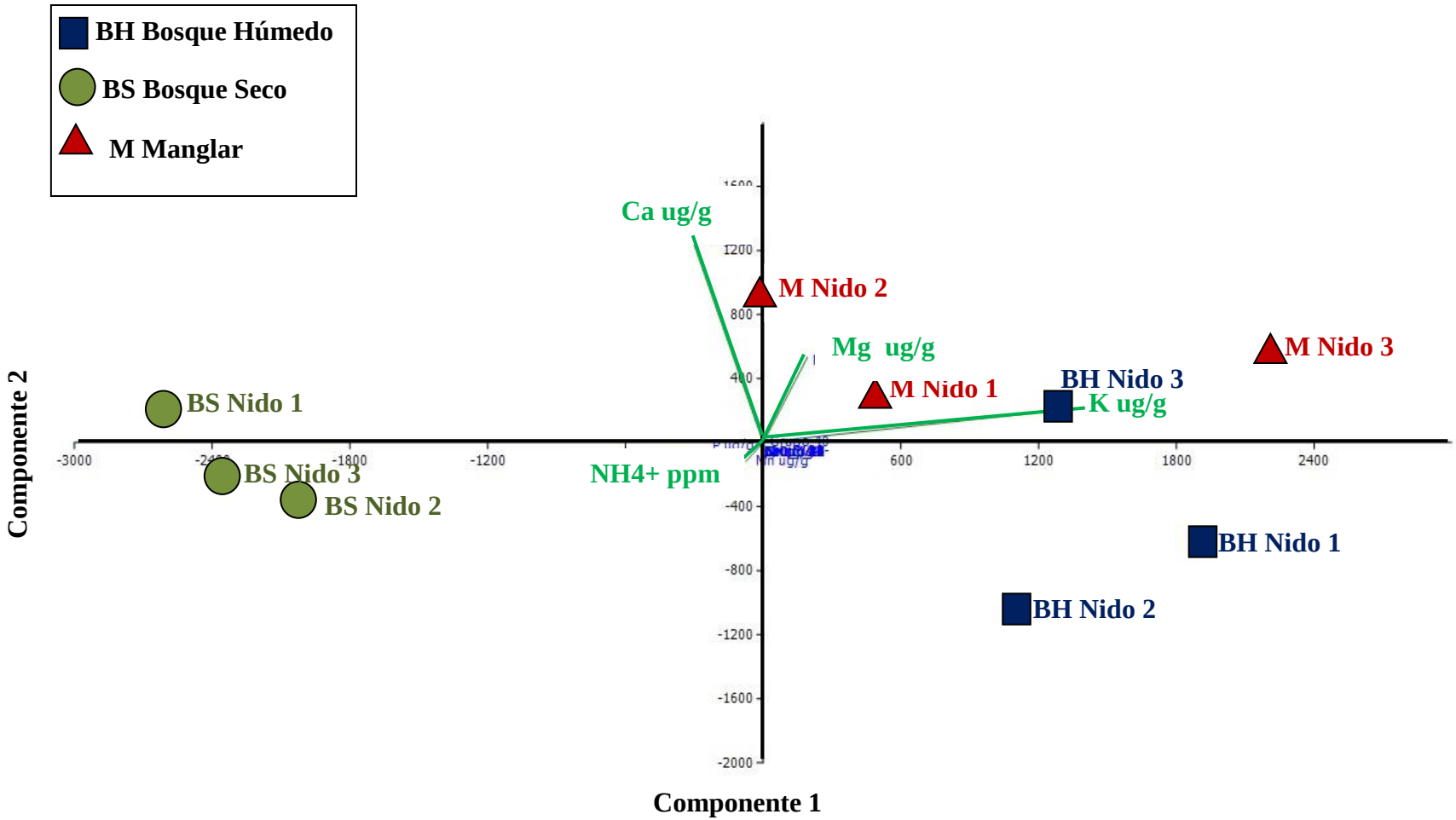


Figura 13. Análisis de componentes principales, correlacionando con cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlea* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). (Como variable se utilizaron los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX-PCR) con la composición del material de los nidos).

3.9. Índices de Diversidad

Los índices de diversidad fueron realizados a partir de los grupos obtenidos con el dendrograma de BOX-PCR, se muestran en las Tablas 7 y 8. La Tabla 7 muestra la diversidad que aporta el ambiente en esa comunidad de bacterias de *Streptomyces* presentes en los nidos aislados de las tres zonas ecológicas y la Tabla 6 muestra la diversidad que aporta cada especie de termita a la comunidad de *Streptomyces* aislados de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae.* Según los índices de diversidad con respecto al ambiente y a la especie de termita, todos los linajes de *Streptomyces* están igualmente representados en cada uno de los ambientes, la comunidad es diversa y no está dominada por un linaje de *Streptomyces* en particular (Tabla 7 y 8). El índice de riqueza de especies está indicando el número de especies que se encuentran en la comunidad que se está evaluando; en este caso la riqueza de especies más alta se ve en los nidos de *N. costalis* mostraron 39 especies o unidades taxonómicas, que corresponde en realidad a grupos de *Streptomyces* diferente encontrados en los nidos de esta termita (Tabla 8).

Tabla 7. Índices de diversidad de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). Para la zona ecológica. (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX-PCR)

Índices de diversidad	**Grupos de *Streptomyces* para cada zona ecológica**		
	Bosque Húmedo	**Bosque Seco**	**Manglar**
Dominance_D D=0 Todas las especies están igualmente presentes D=1 Una especie domina la comunidad por completo	0.07243	0.03872	0.04826
Simpson_1-D S=0 Baja entropía (una especie o algunas) S=1 Alta entropía (Comunidad diversa)	0.9276	0.9613	0.9517
Shannon_H H=0 Solo una especie en la comunidad H>0 Más que una especie en la comunidad	3.009	3.374	3.244
Taxa S Riqueza de especies	31	35	34

Tabla 8. Índices de diversidad de cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; bosque húmedo (Mayagüez), bosque seco (Guánica) y manglar (Joyuda). Para la especie de termita. (Como variable se utilizó los grupos obtenidos del dendrograma realizado a partir de la técnica de BOX-PCR)

Índices de diversidad	**Grupos de *Streptomyces* para especie de termita**	
	N. costalis	***N. acajutlae***
Dominance_D D=0 Todas las especies están igualmente presentes D=1 Una especie domina la comunidad por completo	0.0401	0.03724
Simpson_1-D S=0 Baja entropía (una especie o algunas) S=1 Alta entropía (Comunidad diversa)	0.9599	0.9628
Shannon_H H=0 Solo una especie en la comunidad H>0 Más que una especie en la comunidad	3.406	3.395
Taxa S Riqueza de especies	39	35

3.10. Microscopia Electrónica

Finalmente, la foto de microscopia electrónica (Figura 14) del material interno de un nido de *N. costalis* mostró estructuras que por su tamaño y forma podría tratarse de bacterias que estén allí cumpliendo un papel especifico en los nidos de termitas.

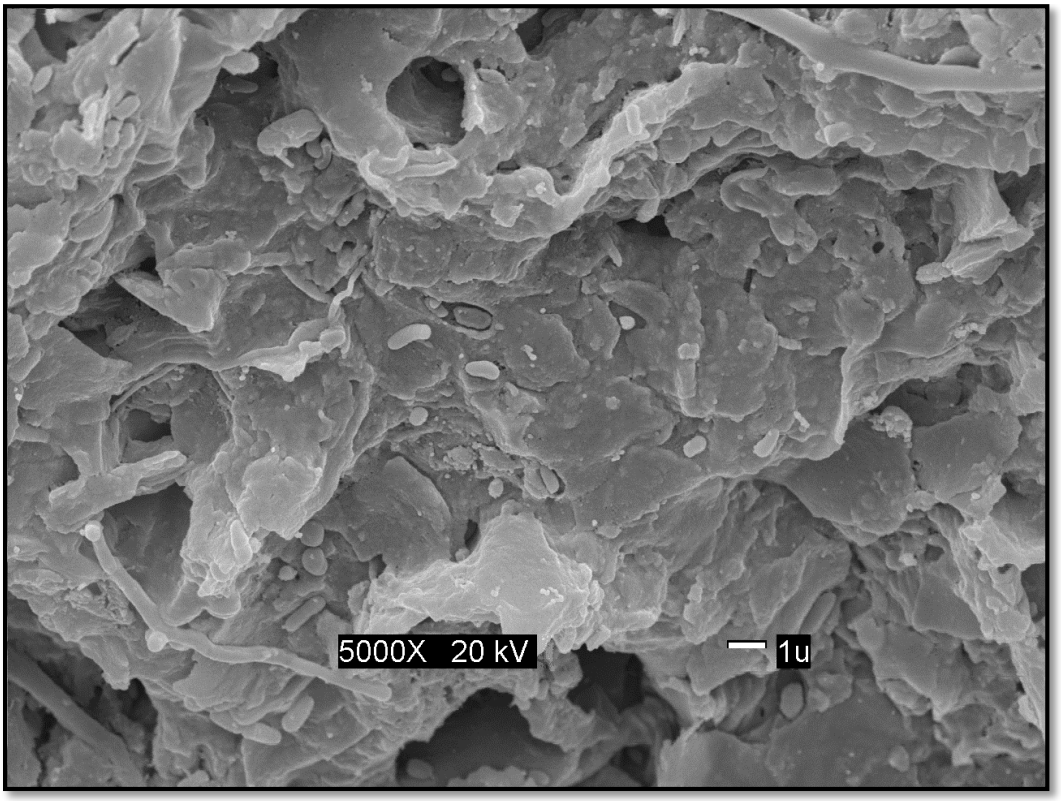


Figura 14. Microscopia electrónica de la parte interna de un nido de *Nasutitermes costalis* del bosque húmedo (Mayagüez). Se observan estructuras que por su tamaño se puede inferir que se trata de bacterias en íntima asociación del material del nido.

4. Discusión

El número más alto de colonias aisladas se presentó en los nidos de *N. acajutlae* procedentes del bosque seco de Guánica (Figura 3). Los *Streptomyces* son bacterias quimiorganótrofas con requerimientos nutricionales básicos que se limitan a una fuente de carbono, una fuente nitrogenada inorgánica como $NO3^-$ y concentraciones de Ca que les sirven

para su crecimiento y la neutralización de ácidos en el ambiente producido por otras bacterias (Maclntosh, 2010; Ventura et al., 2007). Puede ser que la abundancia de colonias aisladas de los nidos del bosque seco se deba a que éstos mostraron concentraciones más altas $NO3^-$ y Ca con respecto a los nidos de las otras dos zonas ecológicas (Tabla 5; Figura 12).

Según los grupos formados en el dendrograma del análisis de BOX-PCR; el 57% de ellos contienen cepas asociadas de los nidos de ambas especies de termitas, *N. costalis* y *N. acajutlae,* y a su vez de las tres zonas ecológicas. Esto nos indica que más de la mitad de esta comunidad de *Streptomyces* va a ser común a los 5 factores evaluados. El otro 43% mostró grupos de *Streptomyces* aislados exclusivamente de un sola zona ecológica o que provenían de nidos de la misma termita pero localizados en ambientes diferentes. Es interesante que estos grupos exclusivos a un ambiente o especie de termita presentaron cepas aisladas con mayor frecuencia; dilucidando que estos grupos más específicos van a ser más abundantes. Su especificidad y abundancia puede que se deba a que estén cumpliendo un papel específico en los nidos de termita y sean potenciales simbiontes.

En la Universidad de Puerto Rico-Mayagüez en trabajos previos del Laboratorio de Simbiosis se realizaron bioensayos con dos cepas de hongos entomopatógenos que atacan nidos de hormigas y son utilizados como biocontrol de termitas, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana.* La mayoría de las cepas de *Streptomyces* inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos señalándolas como posibles candidatas a cumplir un rol de defensa en los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* (Méndez, 2013).

En esta investigación se estudió cualitativamente un potencial rol alimenticio de las cepas de *Streptomyces* que se encuentran en los nidos a través de la capacidad degradativa de celulosa de las mismas. Más del 95% de las cepas de las tres zonas ecológicas evaluadas tienen esta

capacidad. Las dos especies de termitas utilizadas en esta investigación se alimentan de madera y construyen sus nidos con materia orgánica, heces fecales y saliva (Eggleton, 2011; Vasconcellos y Moura, 2010). Su alimento contiene altas cantidades de celulosa, un polisacárido que es difícil de hidrolizar debido a su estructura altamente cristalina (Pérez y Mazeau, 2005). *Streptomyces* es un género ecológicamente importante, especialmente en el suelo donde son vitales en la descomposición de la celulosa y otros polímeros. Takasuka et al., (2012) estudiaron la capacidad degradativa eficiente de la celulosa en 180 cepas de *Streptomyces* asociadas a insectos y conmprobaron que solo un 14% de ellas lo hace efectivamente. Sin embargo, casi todas las cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de termitas en esta investigación posee la capacidad efectiva de degradar celulosa. Puede ser que *N. costalis* y *N. acajutlae* estimulen la actividad degradativa de estos *Streptomyces* proporcionando compuestos de carbono y azucares cuando construyen sus nidos. Condicionalmente, estas cepas de *Streptomyces* tienen la capacidad adaptativa ventajosa frente a otros microorganismos en estos nidos favorecidas por las termitas. A su vez es posible que en su búsqueda por prevalecer compitieron por su nicho (Oakley et al., 2010), indirectamente estén beneficiando las termitas ya sea con esta capacidad degradadora de celulosa o con la producción de metabolitos secundarios que aun no se ha determinado.

Es lógico pensar que como este tipo de termitas construye sus nidos con saliva, heces fecales y madera (Eggleton 2011; Vasconcellos y Moura, 2010), los *Streptomyces* provengan del intestino de la termita la cual presenta una gran cantidad de simbiontes de este género, que le ayudan a degradar la celulosa (Pasti et al., 1990). Sin embargo, Méndez, (2013) estudió la diversidad de actinobacterias asociadas a los nidos de *N. costalis* y encontró que éstas se agrupaban en un linaje diferente a las aisladas del intestino y del exosqueleto de la termita;

además sus secuencias del 16S ribosomal no fueron similares a ninguna secuencias presente en GenBank.

Otro estudio (Fall et al., 2007) que comparó la estructura de la comunidad bacteriana de los nidos, las secciones del intestino y los alrededores del suelo de la termita *Cubitermes niokoloensis* usando la técnica de PCR en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) encontró diferencias drásticas entre la genética de las comunidades bacterianas de los intestinos de las termitas y del nido. Los nidos estaban dominados por actinobacterias mientras que los intestinos de la termita estaban dominados por firmicutes y proteobacterias. Además, los análisis filogenéticos revelaron que los filotipos de actinobacterias del suelo circundante fueron diferentes a los encontrados en los nidos mostrando que los nidos presentan un tipo de comunidad bacteriana especifica (Fall et al., 2007). Otro factor importante que podría estar favoreciendo la presencia de un grupo de *Streptomyces* específico para los nidos de termitas es la temperatura. Se sabe que las termitas autoregulan la temperatura de sus nidos (Jones y Oldroyd, 2006; Korb y Linsenmair, 1999). Es posible que también favorezcan el desarrollo cierto tipo de bacterias diferentes a la del ambiente circundante y a las que habitan en su tracto digestivo.

Otra de las pruebas que se realizó para determinar el posible rol de la comunidad de *Streptomyces* en los nidos de termita fue la evaluación del material del nido ya que la alta concentración de materia orgánica en los nidos puede estar favoreciendo el desarrollo de una comunidad de *Streptomyces* específica para estos nidos. Estudios en otra especie de termita arbórea del mismo género, *N. ephratae*, se compararó la composición de los nidos con el suelo circundante y encontraron que los nidos de *N. ephratae* contienen más C, N y P que la superficie del suelo debido a la utilización por parte de las termitas de materia fecal para la construcción de las paredes y galerías del nido (López-Hernández, 2001). Por otro lado, Kaschuk et al., (2006)

realizaron estudios físico-químicos de los nidos de termitas que se alimentan de suelo y fabrican sus nidos con partículas del mismo y heces fecales concluyendo que las termitas modifican las características del suelo aumentando el contenido de K, P, Ca, Mg y C. Aunque en este estudio no se realizó análisis de la microbiota o los nutrientes del suelo circundante de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae*, se obtuvieron valores equivalentes en K, P, Ca, Mg, C, N y P evaluados en las anteriores investigaciones mencionadas. Es válido comparar estos resultados dado que comparten la construcción de sus nidos también con saliva y heces fecales. El análisis del material del nido de principales componentes mostró que NH4+, K, Ca y Mg son el principal componente con las variables que presentan mayor correlación, las cuales están explicando mejor la diversidad de los grupos de *Streptomyces* y separan los nidos de ambas especies de termitas; este análisis si muestra diferencias en los grupos asociados a cada especie de termita.

Sin embargo, estadísticamente los índices de diversidad nos están indicando una comunidad diversa, en donde ningún grupo de *Streptomyces* domina la comunidad; ni hay grupos específicos en una zona ecológica u otra; mucho menos de una especie de termita a otra (Tabla 7 y 8). Esto puede deberse a que las zonas ecológicas no presentaron ambas especies de termita, es posible que esto, esté aportando al estadístico mucha variación y por esa razón no se observen diferencias significativas. En futuros análisis se puede excluir los nidos de el bosque seco que corresponden a la especie de termita *N. acajutlae* y comparar los nidos del manglar y bosque húmedo que presenta la misma especie de termita *N. costalis*.

La morfología microscópica en *Streptomyces* permitió reconocer algunas formas típicas y particulares que se presentaron con mayor frecuencia en cada una de las zonas ecológicas evaluadas (Tabla 3). Estas morfologías en su clasificación no coincidieron con las establecidas a partir de la técnica de BOX-PCR y el análisis filogenético a partir de las secuencias del 16S

ribosomal. La morfología microscópica no es un buen carácter de clasificación en el género *Streptomyces*.

El análisis de las secuencias del 16S ribosomal de las cepas aisladas de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* de las tres zonas ecológicas de Puerto Rico confirmó que las bacterias aisladas pertenecen al género *Streptomyces.* A pesar de que el árbol filogenético agrupó estas cepas en 28 grupos (Figura 10), se puedo observar que están estrechamente relacionadas y que ni el ambiente, ni la especie de termita, están mostrando grupos excesivamente aislados uno del otro. El género *Streptomyces* se caracteriza por estar en todas partes; tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Thakur et al., 2007; Moran et al., 1995). Sobre este género existen gran cantidad de estudios relacionados con su producción de metabolitos secudarios (Challis y Hopwood, 2003) y sus relaciones simbióticas con otros insectos, como por ejemplo, la avispa europea *Philanthus triangulum* con asociación del genero en sus antenas (Kaltenpoth et al., 2005). A pesar de ésto, faltan muchos aspectos biológicos de estas bacterias por descubrir. Este estudio caracterizó por primera vez cepas de *Streptomyces* aisladas de nidos de dos especies de termitas arbóreas de tres zonas ecológicas diferentes de Puerto Rico; se encontraron grupos específicos de éstas para cada ambiente y especie de termita sin embargo más del 50% de ellas estaban relacionadas. Hongoh et al., (2005) han publicado desde el 2003 varios artículos relacionados con la microbiota en el intestino de diferentes especies de termitas encontrando que estas bacterias no se parecen a ningún linaje antes reportado, pero forman un grupo monofilético entre ellas; su hipótesis es que se puede tratar de bacterias simbióticas de las termitas; presentes antes de la especiación (Hongoh et al., 2003; 2005; 2006). En las termitas ya se han establecido relaciones endosimbióticas y exosimbióticas; bacterias digestivas y hongos nutricios, respectivamente (Um et al., 2013; Pasti et al., 1990). Aunque es temprano para afirmar que algo

similar está sucediendo con los *Streptomyces* aislados de los nidos de termitas es interesante que este estudio está mostrando un grupo filogenéticamente relacionado a estos nidos. Esta investigación puede ser la base para análisis filogenéticos con técnicas independientes de cultivo de los *Streptomyces* asociados al material del nido de termitas que permitan establecer si existe o no una relación directa de estas bacterias con las termitas de estas dos especies.

Futuros estudios deben centrarse en un análisis metagenómico de la microbiota de *Streptomyces* presente en el intestino, el material del nido, el suelo circundante y la madera de la que se alimenta estas dos especies de termitas, *N. costalis* y *N. acajutlae*, y de esta forma, determinar si las cepas de *Streptomyces* son nativos de los nidos o provienen de otro sitio. Además realizar bioensayos *in vitro* e *in vivo* causando infecciones con hongos patógenos a nidos de termita, que permitan determinar si estos *Streptomyces* cumple un rol protector en los mismos.

5. Conclusiones

- La mayoría de las cepas de *Streptomyces* aisladas de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* están presentes en ambas especies de termitas y en las tres zonas ecológicas.

- *Streptomyces* aislados exclusivamente de los nidos de *N. costalis* o *N. acajutlae* pueden estar directamente asociadas a la termita y ser potenciales simbiontes.

- El componente principal del material del nido compuesto por las variables NH4+, K, Ca y Mg es el que mejor explica los grupos de *Streptomyces* aislados de los nidos de termita.

- La comunidad de *Streptomyces* aislados de los nidos de *N. costalis* y *N. acajutlae* es diversa y ningún grupo de *Streptomyces* domina la comunidad.

Bibliografía

Amal A. M., Abeer K. A., Samia H. M., Nadia Abd El-N. H., Ahmed K.A. y H.M. El-Hennawi .2011. Selection of Pigment (Melanin) production in Streptomyces and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics. Research journal of chemical sciences. 1 (5): 22-28.

Baharlouei A., Sharifi-Sirchi1 G. R y G. H. Shahidi Bonjar. 2010. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential biocontrol Agent, *Streptomyces plicatus* Strain 101, and its New Antagonistic Spectrum of Activity. The philippine agricultural scientist 93 (4): 439-445.

Bibb M. J., 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomycetes*. Current opinion in microbiology. 8 (2): 208-215.

Bray R. H y L. T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. Soil science society of america journal 59: 39-45.

Cafaro M. J., Poulsen M., Little A. E. F., Price S. L., Gerardo N. M., Wong B., Stuart A. E., Larget B., Abbot P y C. R. Currie. 2011. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. Proceeding the royal society. biological sciences 1-13.

Challis G. L y D. A. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceendings of the national academy of sciences USA 100 (2): 14555-14561.

Costa-Leonardo A. M., Casarin F E y J. T. Lima. 2009. Chemical communication in isoptera. Neotropical entomology 38 (1): 1-6.

Dashtban M., Maki M., Leung K. T., Mao C y W. Qin. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. Critical reviews in biotechnology 1-8.

Dastager S. G., Wen-Jun Li., Dayanand A., Shu-Kun Tang., Xin-Peng Tian., Xiao-Yang Zhi., Li-Hua. Xu y Cheng-Lin Jiang. 2006. Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces.* African journal of biotechnology. 5 (8): 1131-1134.

Demain A. L. 1998. Microbial natural products: Alive and well in 1998. Nature biotechnology16: 3- 4.

Efthimiou G., Thumser A. E y C. A. Avignone-Rossa. 2008. A novel finding that Streptomyces clavuligerus can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source. Journal of applied microbiology. 105: 2058–2064.

Eggleton P. 2011. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology 1-26p. en: Bignell D E. Roisin Y. Lo. Biology of termites: A modern synthesis. Springer. Australia.

Etcheverry C., Godoy M. C y G. J. Torales. 2010. Dinamica poblacional de *Nasutitermes aquilinus* (insecta, isoptera, termitidae) en la provincia de corrientes (Argentina) Facena 26:15-27.

Fall S., Hamelin J., Ndiaye F., Assigbetse K., Aragno M., Chotte J. L y A. Brauman. 2007. Differences between Bacterial Communities in the Gut of a Soil-Feeding Termite (*Cubitermes niokoloensis*) and Its Mounds. Applied and environmental microbiology 73 (16): 5199-5208.

Fuller C. A., Rock P y T. Philips. 2003. Behavior, color changes, and predation risk Induced by acanthocephalan Parasitism in the caribbean termite *Nasutitermes acajutlae.* Caribbean journal of science 39(1):128-135.

Gao B y S. Radhey. 2005. Gupta conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology 55: 2401-2412.

Hassan, A y E. M. H. Wellington. 2009. *Actinobacteria.* En: Encyclopedia of microbiology. pp. 25-44 . Elsevier.

Healy M., Huong J., Bittner T., Lising M., Frye S., Raza S., Schrock R., Manry J., Renwick A., Nieto R., Woods C., Versalovic J y J. R. Lupski. 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. Journal of clinical microbiology 43(1):199-207.

Hongoh Y., Deevong P., Inoue T., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Ohkuma M., Vongkaluang C., Noparatnaraporn N y T. Kudo. 2005. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. Applied and environmental microbiology, 71 (11): 6590–6599.

Jones Jr. J. B., 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRC Press, Boca Raton. Forida pag 364.

Jones J. C y B. P. Oldroyd. 2006. Nest thermoregulation in social insects. Advances in insect physiology. 33: 153–191.

Kaltenpoth M., Gottler W., Herzner G y E. Strohm. 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. Current biology 15: 475–479.

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

Kämpfer P. 2006. The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy, En M. Dworkin (ed), Prokaryotes pp 3:538–604 springer New York.

Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S y A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Current microbiology 57(5):503-507.

Kaschuk G., Santos J. C. P., Almeida J. A., Sinhorati D. C y J. F. Berton-Junior. 2006. *Note* Termite activity in relation to natural grassland soil attributes. Scientia agricola 63 (6): 583-588.

Klepzig K. D., Adams A. S., Handelsman J y K. F. Raffa. 2009. Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. Environment entomology 38(1): 67-77.

Korb J y K. E. Linsenmair. 2000. Ventilation of termite mounds: new results require a new model. Behavioral ecology 11(5): 486-494.

Korb J. 2008. The Ecology of Social Evolution in Termites. 151-174p. En: Korb y J Heinze Ecology of Social Evolution. Editors Springer. Osnabrück - Alemania.

Lanoot B., Vancanneyt M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y. Liu Z y J Swings. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces.* Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus, S. fradiae, S. tricolor, S. colombiensis,S. filamentosus, S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus* , Systematic applied microbiology 27: 84-92.

León J., Liza L., Soto I., Cuadra D., Patiño L y R. Zerpa. 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Revista Peru de biología 14(2): 259-270.

Leyden J. J. 2001. Current issues in antimicrobial therapy for the treatment of acne. Journal european academy dermatology and venereology.15(3):51-55.

Lopez-Hernandez D. 2001. Nutrient dynamics (C, N and P) in termite mounds of *Nasutitermes* Ludwig W y H. P. Klenk. 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systamatics. En Brenner D. J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, pp 49–65.Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Ludwig W y H. P. Klenk. 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for Prokaryotic systematics. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Garrity G. M. Brenner DJ. Krieg N R. y J T Staley Eds.), pp. 49- 65. Springer, New York, NY.

Lynch M.1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. department of ecology, ethology and evolution, University of Illinois. Molecular biology evolution. 5(5):584-599.

MacIntosh A. J. 2010. A study on the growth and metabolic activity of *streptomyces venezuelae.* Master of applied science. Dalhousie University. Department of process engineering and applied science 132 p.

Magarvey N. A., Keller J. M., Bernan V., Dworkin M y D. H. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Applied and environmental microbiology 70(12): 7520-7529.

Márquez M., Martínez M. M y M. Franco.2002. Aislamiento de *trichoderma sp*. y Actinomycetes a partir de Suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y Evaluación de su Capacidad Antagonica in vitro sobre *Fusarium oxysporum*. *F. Dianthi sp*. Agronomía colombiana 19 (1-2): 81-87.

Mendez E. 2013. Diversity of Actinobacteria associated with *Nasutitermes costalis* termite and their ability to inhibit the growth of entomopathogenic fungi. Tesis maestría biología. Universidad de Puerto Rico-Mayagüez. Facultad de Biología 112 p.

Mohanasrinivasan V., SriramKalyan P., Nandi I., Subathradevi C., Selvarajan, E., Suganthi V y N. S. Jemimah. 2013. Fermentative production of extracellular pigment from *Streptomyces coelicolor* MSIS1. Research journal of biotechnology 8 (4): 31-41.

Moran M. A., Rutherford L. T y R. E. Hodson. 1995. Evidence for Indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA Probe. Applied and Environmental Microbiology 61(10): 3695-3700.

Ningthoujam D. S., Sanasam S y S. Nimaichand. 2009.Screening of Actinomycete isolates from niche habitats in manipur for antibiotic activity. American journal of biochemistry and biotechnology 5 (4): 221-225.

Noirot C y J. E.P.C. Darlington. 2000. Termite nest: Architecture, regulation and defence. pp 121-137 En: Abe, T., Bignell, D. E. and H. Masahiko (ed). Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. Kluwer Academic Publishers.

Oakley B. B., Carbonero F., Gast C. J., Hawkins R. J y K. J. Purdy. 2010. Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations. The International Society for Microbial Ecology Journal 4: 488-497.

O'Brien J y G. D. Wright. 2011. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. Current opinion biotechnology 22(4): 552-558.

Ohkuma M., Noda S., Hongoh Y y T. Kudo. 2001. Coevolution of symbiotic systems of termites and their gut microorganisms. Focused on bioarchitect research 41:73-74.

Olive D. M y P. Bean. 1999. Minireview principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms journal of clinical microbiology 37(6): 1661-1669.

Olsen S. R y L. A. Dean. 1965. Phosphorus pp 1044-1046. En: C.A. Black (ed.) Methodos of soil analysis. Agronomy No. 9. American Society of Agronomy. Madison Wisconsi.

Panda T y G.N. Rameshaiah 2009. Application of actinobacterial and fungal morphology on the design of operating strategies in bioprocess development. The Open Biotechnology Journal 3: 31-39.

Pasti M. B., Pometto A. L., Nuti M. P y D. L. Crawford. 1990. Lignin-Solubilizing ability of Actinomycetes isolated from termite (Termitidae) Gutt. Applied and environmental microbiology 56 (7): 2213-2218.

Perez S y K. Mazeau.2005. Conformations, structures, and morphologies of celluloses centre de recherches sur les macromolecules vegetales. in polysaccharides: structural diversity and functional. Second Edition. editado por Dumitriu S. New York 1224 p.

Sadeghi A., Hessan A. R., Askari H., Aghighi S y G. H. Shahidi Bonjar. 2006. Biological control potencial of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. Pakistan journal of biological sciences 9(5): 904-910.

Scheffrahn R. H., Krecek J., Szalanski A. L y J. W. Austin. 2005. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. Entomological society of america 98(3- 2): 273-281.

Scheffrahn R. H., Jones S. C., Krecek J., Chase J. A., Mangold J. R y Su Nan-yao. 2003. Systematics: taxonomy, distribution, and notes on the termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae) of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. Entomological society of America 96(3): 181-201.

Scott J. J., Chan D., Yuceer M. C., Klepzig K. D., Clardy J y C. R. Currie. 2008. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. Science 322(5898): 63.

Scribner III H. E., Terry Tang I y S. G. Bradley. 1973. Production of a Sporulation Pigment by *Streptomyces venezuelae.* American society for microbiology 25 (6): 873-879.

Sparks, D. L. 2007. Methods of soil Analysis part 3: Chemical methods SSSA Book series No.5. Second edition por D.L. Sparks, A.L. Page,P.A. Helmke y R.H. Loeppert. Madison, Wisconsin-USA. 1309 p.

Suiter D R. Jones S C. y B T Forschler. 2009. La biología de termitas subterráneas del este de Estados Unidos. University of Georgia. Boletín 1209-SP.

Takasuka T. E., Book A. J., Lewin G. R., Currie C. R y B. G. Fox. 2012. Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*. Scientific reports 3(1030): 1-10.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B. K y T. C. Bora. 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. Journal de Mycologie médicale 17: 242-249.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M y S. Kumar. 2011. Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution: Oxford Journals pag 1-9.

Um S., Fraimout A., Sapountzis P. Oh D y M. Poulsen. 2013. The fungus-growing termite *Macrotermes natalensis* harbors bacillaene-producing *Bacillus sp*. that inhibit potentially antagonistic fungi. Scientific reports 3 (3250): 1-7.

Vasconcellos A y F. M. S. Moura. 2010. Wood litter consumption by three species of *Nasutitermes* termites in an area of the Atlantic Coastal Forest in northeastern Brazil. Journal of insect science 10 (72): 1-9.

Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F y D. Sinderen .2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiology and molecular biology reviews 71 (3): 495–548.

Apéndice 1. Caracterización de cepas aisladas de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres Zonas ecológicas de Puerto Rico Bosque Húmedo (Mayaguez), Bosque seco (Guánica) Manglar (Joyuda)

Información general					Características de la colonia			
Código	**Nido**	**Zona Ecológica**	**Especie de termita**	**Frecuencia**	**Forma**	**Margen**	**Elevación**	**Color de la colonia**
SNaP1-1	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Convexa	Abano
SNaP1-2	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Filamentoso	Convexa	Blanco
SNaP1-3	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Lobulado	Umbunada	Abano
SNaP1-4	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	6	Filamentosa	Entera	Crateriforme	Blanco
SNaP1-5	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Convexa	Marrón
SNaP1-6	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Filamentoso	Umbunada	Crema
SNaP1-7	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Serrado	Umbunada	Crema
SNaP1-8	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Puntiforme	Entero	Convexa	Crema
SNaP1-9	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Filamentoso	Umbunada	Blanco
SNaP1-10	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Circular	Rizado	Plana	Blanco
SNaP1-11	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	26	Circular	Undulante	Crateriforme	Abano
SNaP1-12	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	8	Circular	Undulante	Crateriforme	Abano
SNaP1-13	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Filamentoso	Crateriforme	Blanco
SNaP1-14	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Umbunada	Abano
SNaP1-15	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Lobulado	Umbunada	Marrón
SNaP1-16	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Lobulado	Umbunada	Amarillo
SNaP1-17	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Crateriforme	Abano
SNaP1-18	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Undulante	Umbunada	Blanco
SNaP1-19	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Rizoide	Lobulado	Crateriforme	Crema

SNaP1-20	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Convexa	Crema
SNaP1-21	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP1-22	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Lobulado	Umbunada	Abano
SNaP1-23	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Abano
SNaP1-24	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Abano
SNaP1-25	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP1-26	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Filamentoso	Umbunada	Crema
SNaP1-27	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Undulante	Crateriforme	Amarillo
SNaP1-28	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Crateriforme	Blanco
SNaP1-29	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Abano
SNaP1-30	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Filamentoso	Plana	Crema
SNaP1-31	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Entero	Plana	Crema
SNaP1-32	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Undulante	Plana	Crema
SNaP1-33	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Undulante	Convexa	Naranja
SNaP1-34	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Convexa	Crema
SNaP1-35	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Umbunada	Abano
SNaP1-36	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Convexa	Amarillo
SNaP1-37	1	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Convexa	Gris
SNaP2-1	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Filamentosa	Filamentoso	Umbunada	Amarillo
SNaP2-2	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Undulante	Convexa	Abano
SNaP2-3	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Circular	Rizado	Crateriforme	Blanco

SNaP2-4	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Irregular	Undulante	Umbunada	Amarillo
SNaP2-5	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Filamentosa	Filamentoso	Umbunada	Blanco
SNaP2-6	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	7	Puntiforme	Entero	Convexa	Amarillo
SNaP2-7	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Irregular	Lobulado	Umbunada	Crema
SNaP2-8	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	7	Circular	Entero	Convexa	Gris
SNaP2-9	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	7	Filamentosa	Undulante	Umbunada	Amarillo
SNaP2-10	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Circular	Undulante	Crateriforme	Blanco
SNaP2-11	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Circular	Undulante	Umbunada	Abano
SNaP2-12	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	7	Circular	Entero	Convexa	Abano
SNaP2-13	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Undulante	Plana	Crema
SNaP2-14	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP2-15	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	9	Circular	Undulante	Umbunada	Gris
SNaP2-16	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP2-17	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Circular	Undulante	Umbunada	Abano
SNaP2-18	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	12	Circular	Rizado	Crateriforme	Amarillo
SNaP2-19	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Circular	Entero	Crateriforme	Blanco
SNaP2-20	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	17	Filamentosa	Undulante	Plana	Gris
SNaP2-21	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Undulante	Plana	Crema
SNaP2-22	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Amarillo
SNaP2-23	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Rizado	Umbunada	Blanco
SNaP2-24	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Abano
SNaP2-25	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Rizoide	Filamentoso	Plana	Blanco
SNaP2-26	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Crateriforme	Crema
SNaP2-27	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Circular	Undulante	Umbunada	Marrón
SNaP2-28	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP2-29	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Circular	Undulante	Umbunada	Blanco

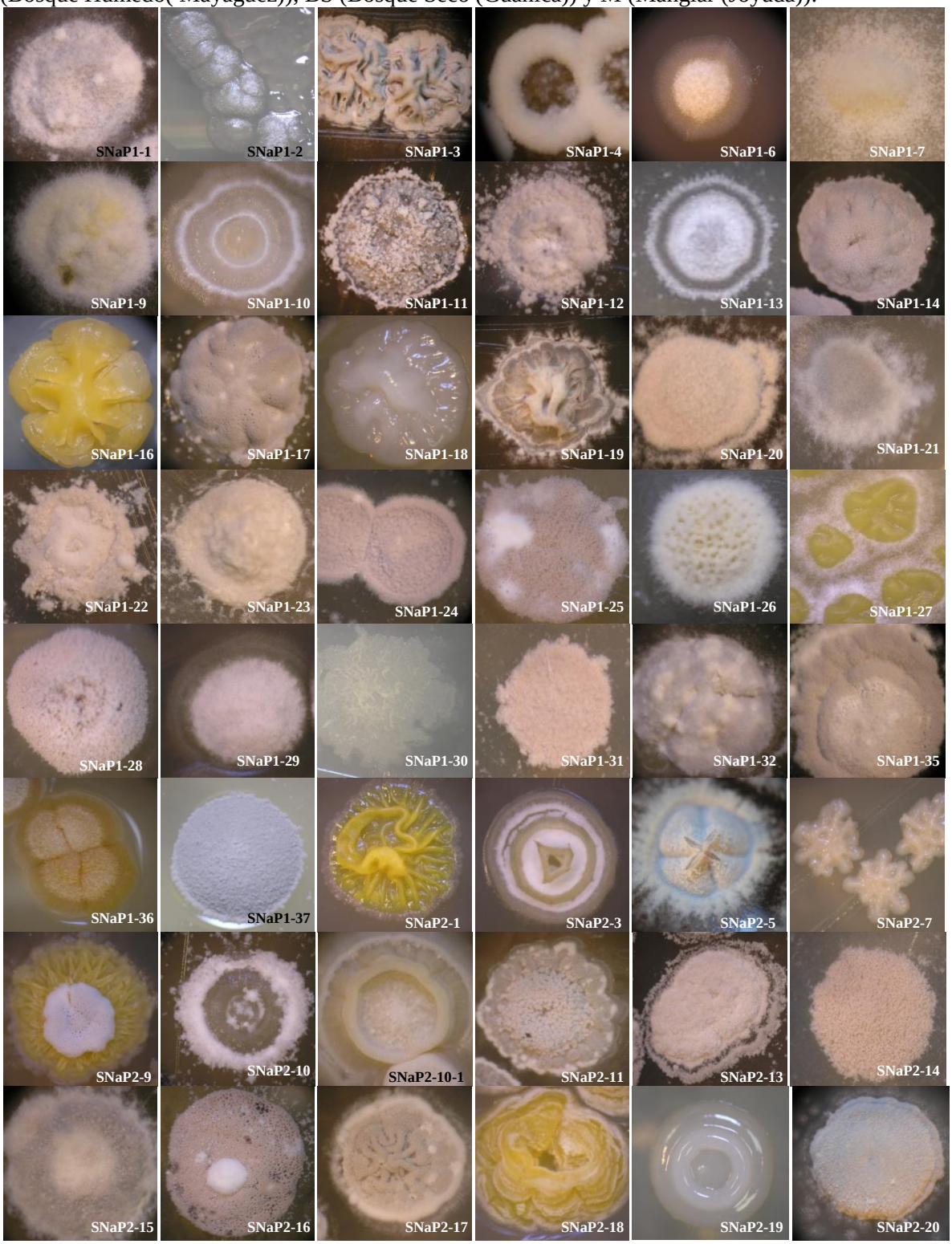
SNaP2-30	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Amarillo
SNaP2-31	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Irregular	Undulante	Convexa	Gris
SNaP2-32	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Plana	Abano
SNaP2-33	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Lobulado	Umbunada	Amarillo
SNaP2-34	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP2-35	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Abano
SNaP2-36	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Undulante	Umbunada	Blanco
SNaP2-37	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP2-38	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Crateriforme	Crema
SNaP2-39	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Entero	Crateriforme	Blanco
SNaP2-40	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Gris
SNaP2-41	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Plana	Gris
SNaP2-42	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Gris
SNaP2-43	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Lobulado	Convexa	Crema
SNaP2-44	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Umbunada	Crema
SNaP2-45	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	5	Circular	Entero	Crateriforme	Gris
SNaP2-46	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Abano
SNaP2-47	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Irregular	Lobulado	Pulvinado	Abano
SNaP2-48	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Filamentosa	Filamentoso	Umbunada	Blanco
SNaP2-49	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Filamentosa	Filamentoso	Crateriforme	Crema
SNaP2-50	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Irregular	Undulante	Crateriforme	Crema
SNaP2-51	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Filamentoso	Crateriforme	Blanco
SNaP2-52	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Rizoide	Undulante	Crateriforme	Blanco
SNaP2-53	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	4	Irregular	Lobulado	Plana	Amarillo
SNaP2-54	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	12	Circular	Entero	Umbunada	Abano
SNaP2-55	2	Boque Seco	*N. acajutlae*	60	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Gris

SNaP3-1	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Abano
SNaP3-2	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Umbunada	Crema
SNaP3-3	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Crema
SNaP3-4	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Umbunada	Blanco
SNaP3-5	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Circular	Rizado	Umbunada	Abano
SNaP3-6	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Umbunada	Amarillo
SNaP3-7	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Undulante	Umbunada	Abano
SNaP3-8	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Undulante	Umbunada	Crema
SNaP3-9	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Undulante	Umbunada	Marrón
SNaP3-10	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Lobulado	Umbunada	Crema
SNaP3-11	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Lobulado	Plana	Amarillo
SNaP3-12	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Irregular	Undulante	Convexa	Crema
SNaP3-13	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Rizoide	Undulante	Elevada	Abano
SNaP3-14	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Crateriforme	Crema
SNaP3-15	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Puntiforme	Undulante	Umbunada	Crema
SNaP3-16	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Undulante	pulvinado	Blanco
SNaP3-17	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Lobulado	Convexa	Gris
SNaP3-18	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Crateriforme	Blanco
SNaP3-19	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Crateriforme	Abano
SNaP3-20	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Blanco
SNaP3-21	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Undulante	Plana	Crema
SNaP3-22	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Circular	Entero	Convexa	Crema
SNaP3-23	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Filamentoso	Convexa	Crema
SNaP3-24	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Undulante	Convexa	Abano
SNaP3-25	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Undulante	Plana	Marrón
SNaP3-26	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Filamentoso	Crateriforme	Blanco

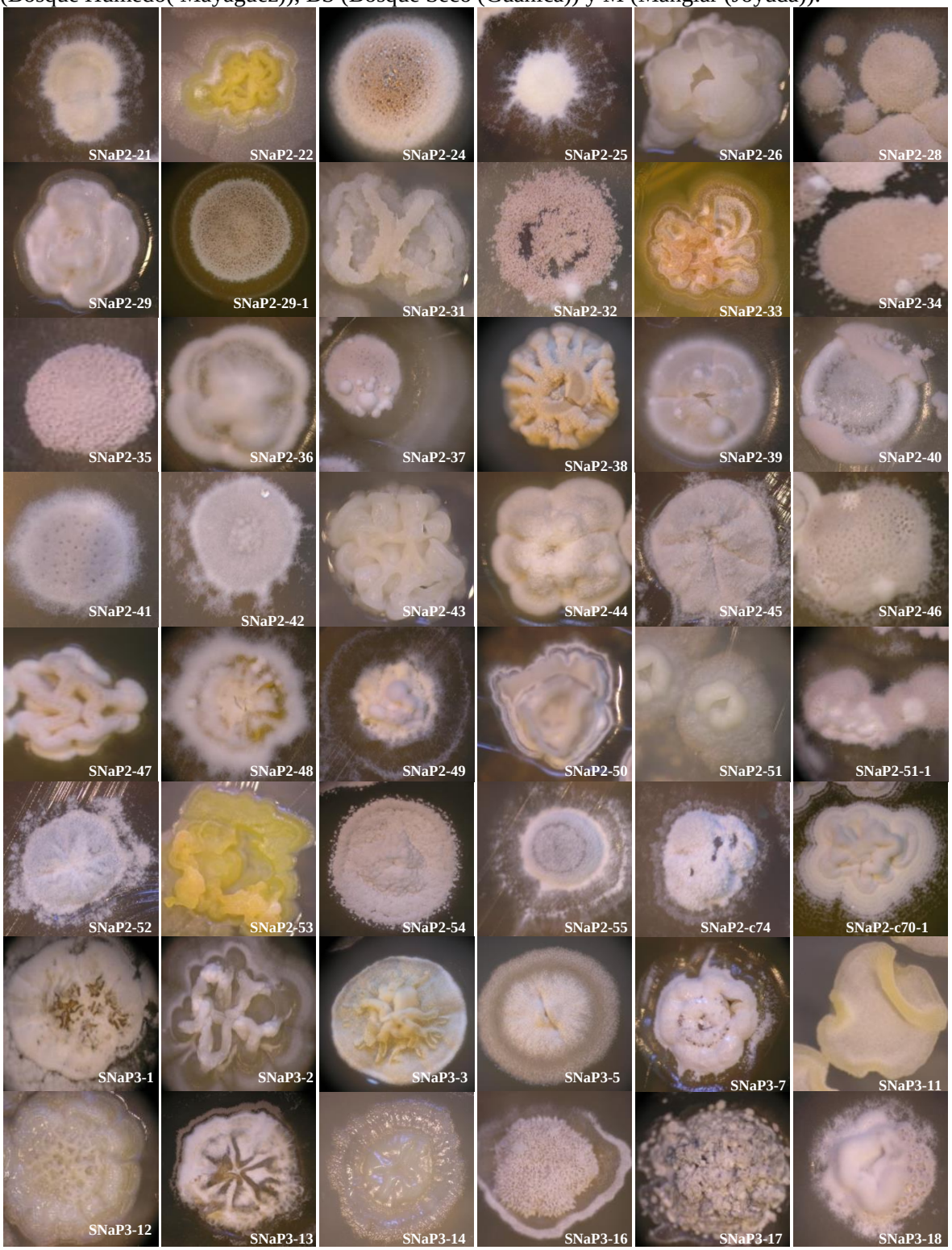
SNaP3-27	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Lobulado	Elevada	Crema
SNaP3-28	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	3	Filamentosa	Rizado	Plana	Blanco
SNaP3-29	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	2	Irregular	Undulante	Umbunada	Crema
SNaP3-30	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	6	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Crema
SNaP3-31	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
SNaP3-32	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	circular	Rizado	Umbunada	Abano
SNaP3-33	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Crateriforme	Blanco
SNaP3-34	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Filamentoso	Convexa	Blanco
SNaP3-35	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Entero	Plana	Crema
SNaP3-36	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Rizado	Plana	Blanco
SNaP3-37	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Undulante	Umbunada	Amarillo
SNaP3-38	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Rosado
SNaP3-39	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Irregular	Undulante	Crateriforme	Crema
SNaP3-40	3	Boque Seco	*N. acajutlae*	1	Filamentosa	Undulante	Crateriforme	Crema
MNcP1-1	1	Manglar	*N. costalis*	2	Filamentosa	Filamentoso	Convexa	Blanco
MNcP1-2	1	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Rizado	Umbunada	Crema
MNcP1-3	1	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Undulante	Convexa	Amarillo
MNcP1-4	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Undulante	Crateriforme	Blanco
MNcP1-5	1	Manglar	*N. costalis*	2	Irregular	Undulante	Crateriforme	Abano
MNcP1-6	1	Manglar	*N. costalis*	1	Filamentosa	Filamentoso	Crateriforme	Blanco
MNcP1-7	1	Manglar	*N. costalis*	4	Circular	Rizado	Crateriforme	Blanco
MNcP1-8	1	Manglar	*N. costalis*	4	Irregular	Lobulado	Convexa	Amarillo
MNcP1-9	1	Manglar	*N. costalis*	3	Irregular	Lobulado	Umbunada	Naranja
MNcP1-10	1	Manglar	*N. costalis*	2	Circular	Rizado	Crateriforme	Naranja
MNcP1-11	1	Manglar	*N. costalis*	2	Circular	Rizado	Umbunada	Naranja
MNcP1-12	1	Manglar	*N. costalis*	2	Irregular	Undulante	Umbunada	Abano
MNcP1-13	1	Manglar	*N. costalis*	1	Filamentosa	Filamentoso	Umbunada	Crema
MNcP1-14	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Plana	Abano
MNcP1-15	1	Manglar	*N. costalis*	8	Puntiforme	Entero	Plana	Naranja
MNcP1-16	1	Manglar	*N. costalis*	3	Circular	Rizado	Plana	Blanco
MNcP1-17	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Marrón

MNcP1-18	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Rizado	Crateriforme	Marrón
MNcP1-19	1	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Undulante	Umbunada	Abano
MNcP1-20	1	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Filamentoso	Convexa	Marrón
MNcP1-21	1	Manglar	*N. costalis*	2	Circular	Entero	Plana	Crema
MNcP1-22	1	Manglar	*N. costalis*	1	Filamentosa	Entero	Plana	Crema
MNcP1-23	1	Manglar	*N. costalis*	4	Puntiforme	Entero	Convexa	Amarillo
MNcP1-24	1	Manglar	*N. costalis*	3	Irregular	Undulante	Convexa	Crema
MNcP1-25	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Rizado	Umbunada	Abano
MNcP1-26	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Plana	Gris
MNcP1-27	1	Manglar	*N. costalis*	37	Circular	Rizado	Plana	Crema
MNcP1-28	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Convexa	Crema
MNcP1-29	1	Manglar	*N. costalis*	7	Circular	Undulante	Umbunada	Crema
MNcP1-30	1	Manglar	*N. costalis*	11	Circular	Undulante	Umbunada	Gris
MNcP1-31	1	Manglar	*N. costalis*	1	Puntiforme	Entero	Umbunada	Rosado
MNcP1-32	1	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Undulante	Crateriforme	Blanco
MNcP1-33	1	Manglar	*N. costalis*	9	Circular	Rizado	Umbunada	Abano
MNcP1-34	1	Manglar	*N. costalis*	14	Puntiforme	Undulante	Umbunada	Blanco
MNcP1-35	1	Manglar	*N. costalis*	3	Irregular	Lobulado	Crateriforme	Blanco
MNcP1-36	1	Manglar	*N. costalis*	18	Irregular	Rizado	Crateriforme	Abano
MNcP1-37	1	Manglar	*N. costalis*	41	Circular	Undulante	Plana	Blanco
MNcP1-38	1	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Undulante	Umbunada	Blanco
MNcP2-1	2	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Undulante	Umbunada	Abano
MNcP2-2	2	Manglar	*N. costalis*	2	Circular	Undulante	Umbunada	Crema
MNcP2-3	2	Manglar	*N. costalis*	2	Filamentosa	Undulante	Crateriforme	Marrón
MNcP2-4	2	Manglar	*N. costalis*	1	Filamentosa	Undulante	Convexa	Marrón
MNcP2-5	2	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Convexa	Roja
MNcP2-6	2	Manglar	*N. costalis*	1	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Blanco
MNcP2-7	2	Manglar	*N. costalis*	1	Irregular	Filamentoso	Plana	Marrón
MNcP2-8	2	Manglar	*N. costalis*	2	Irregular	Undulante	Umbunada	Blanco
MNcP2-9	2	Manglar	*N. costalis*	3	Irregular	Undulante	Umbunada	Marrón
MNcP2-10	2	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Crateriforme	Abano
MNcP2-11	2	Manglar	*N. costalis*	1	Circular	Entero	Plana	Crema
MNcP2-12	2	Manglar	*N. costalis*	2	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Crema

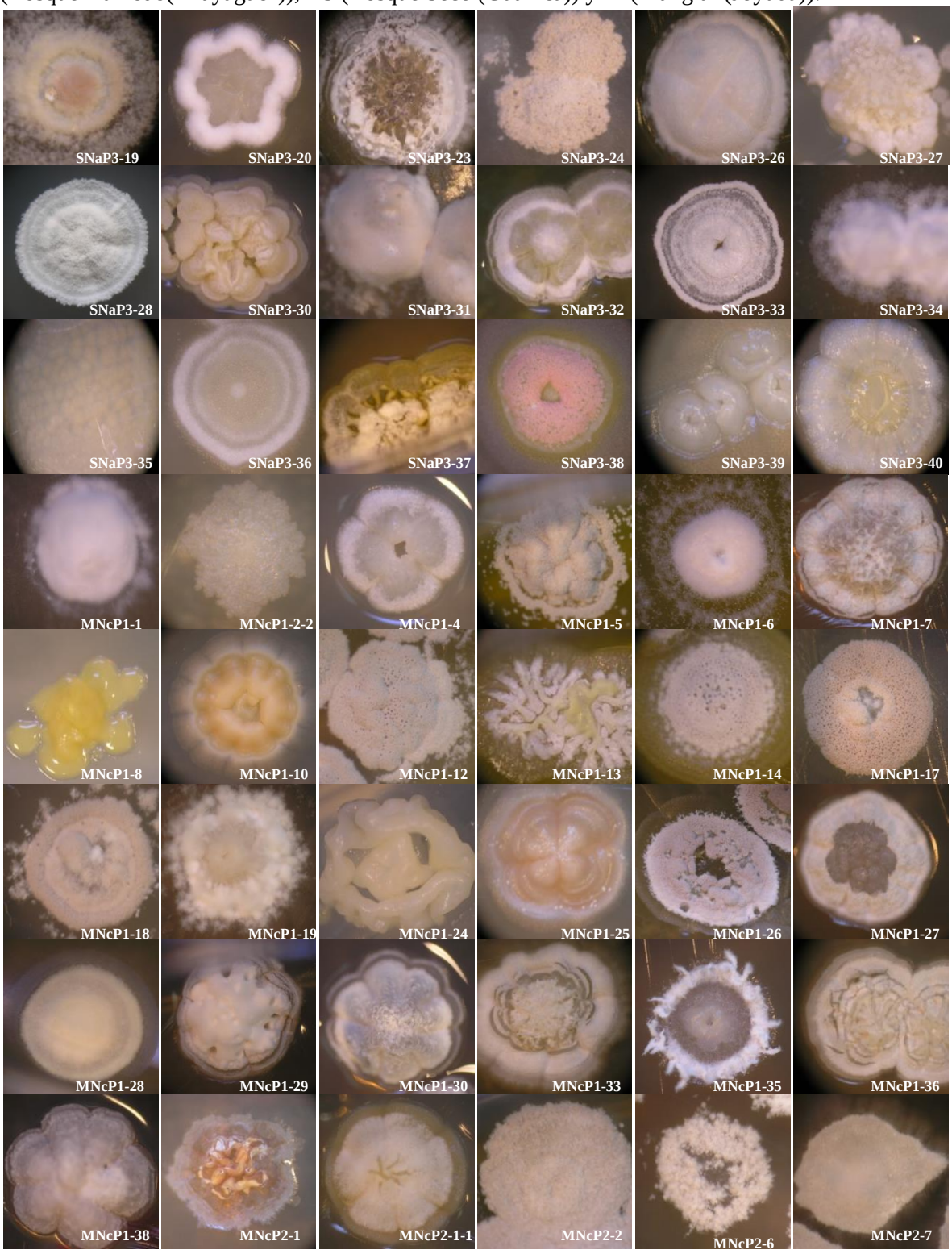
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



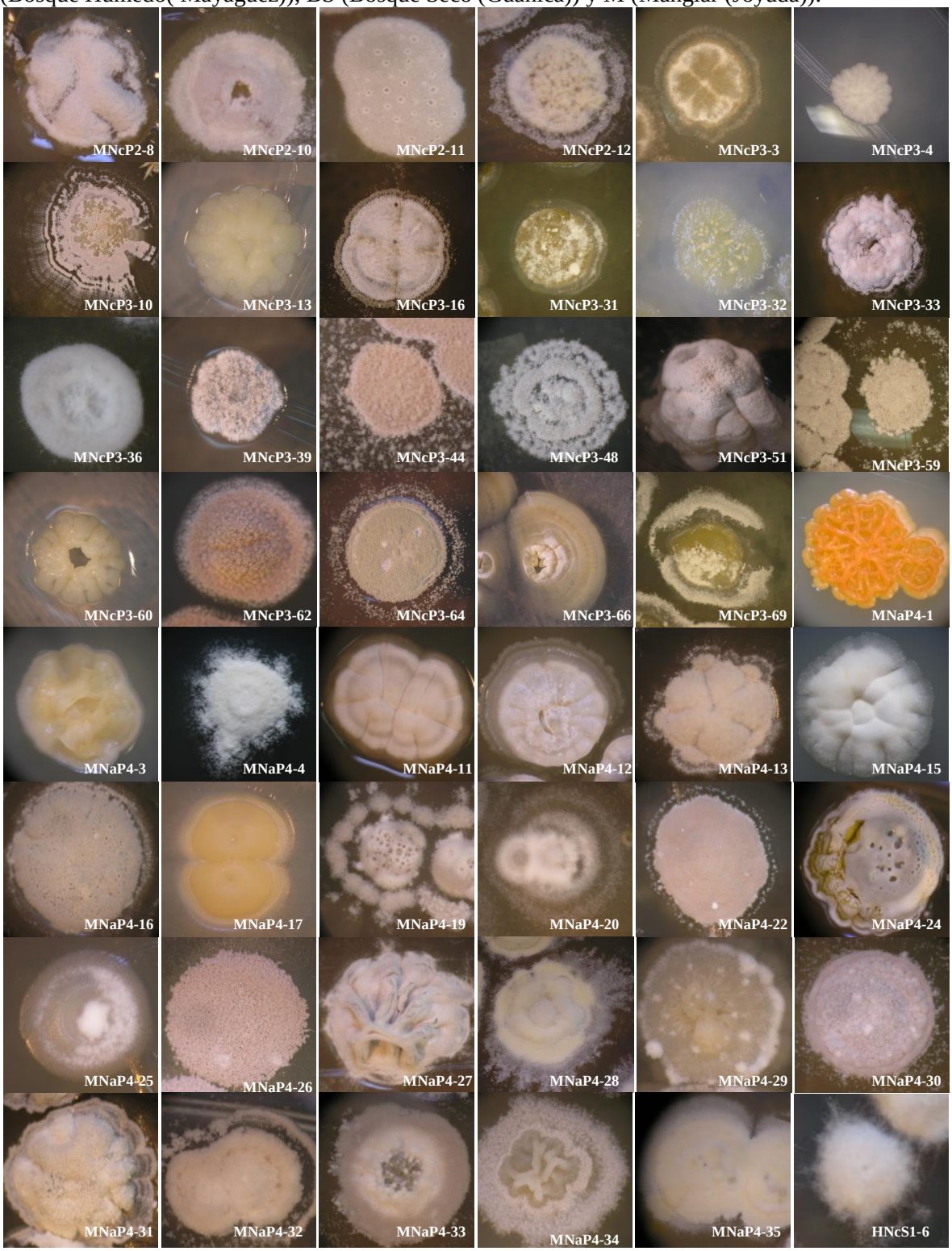
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



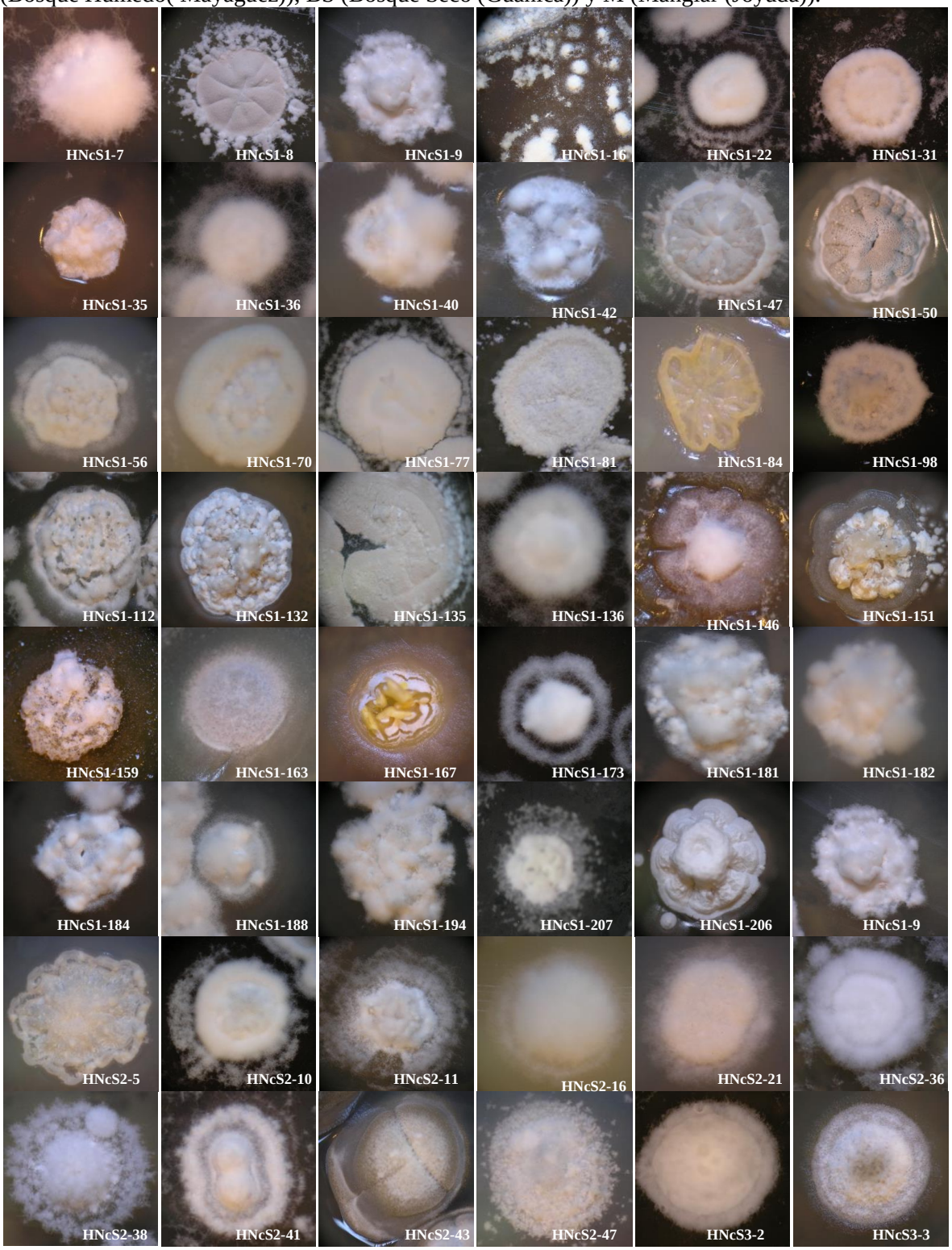
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



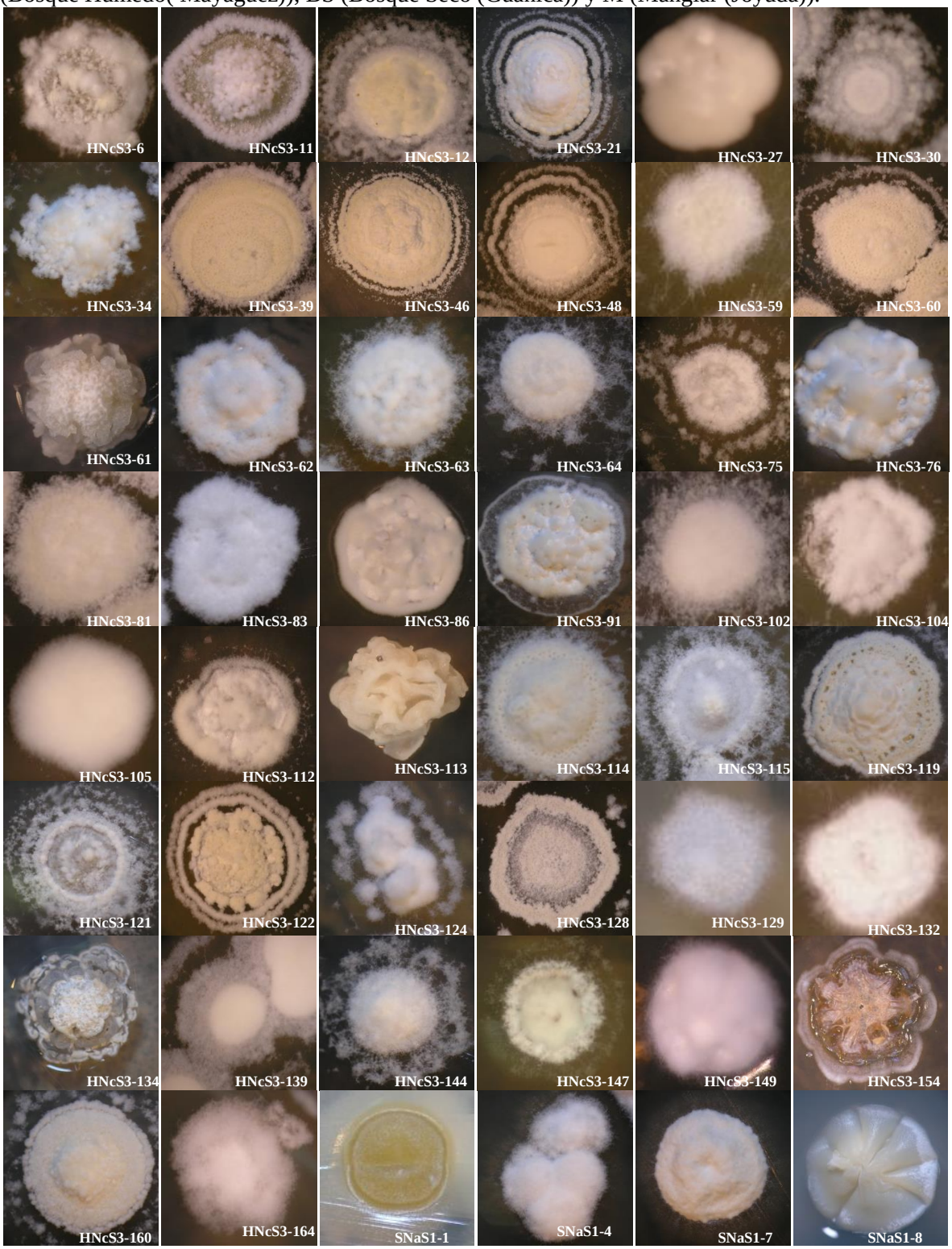
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



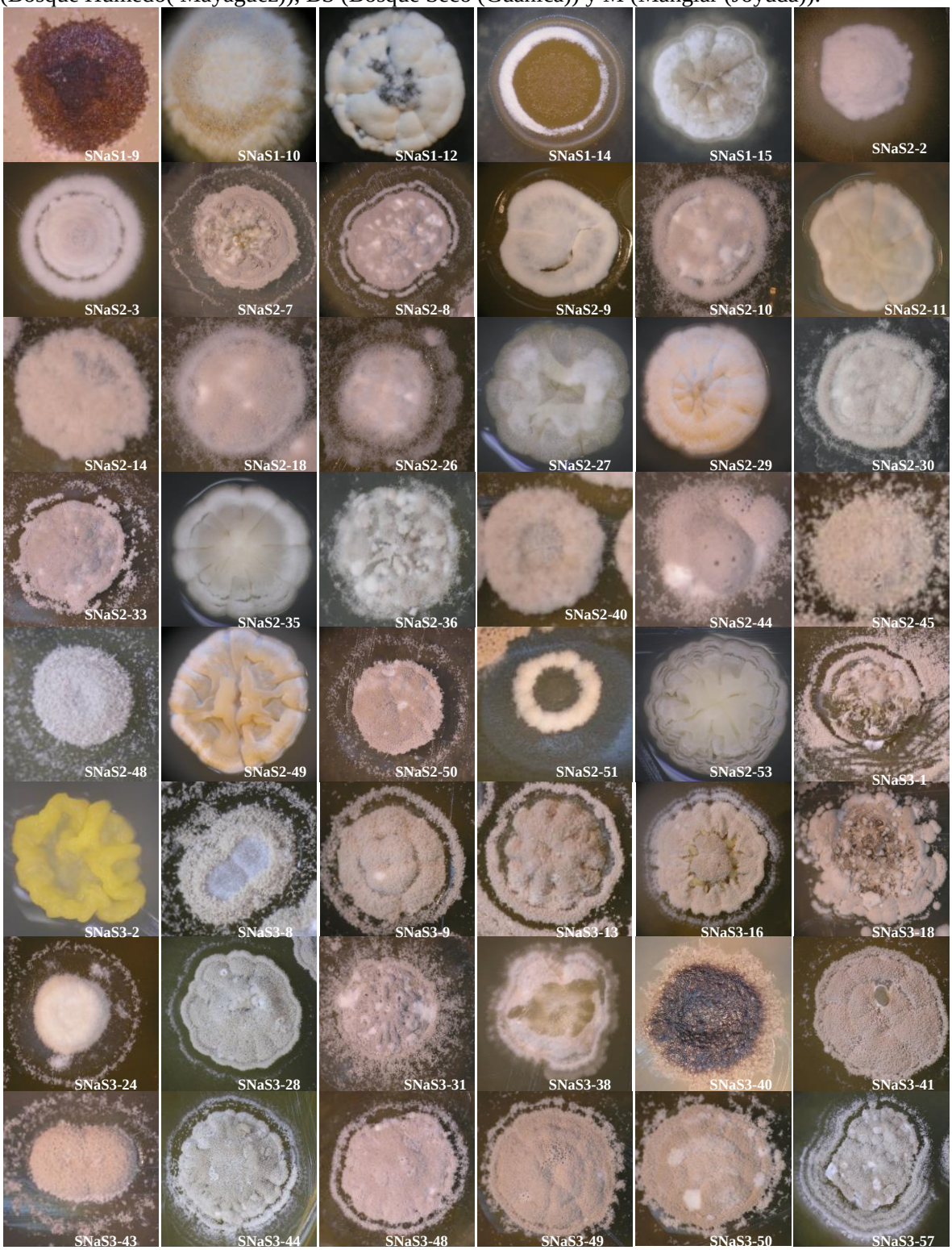
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



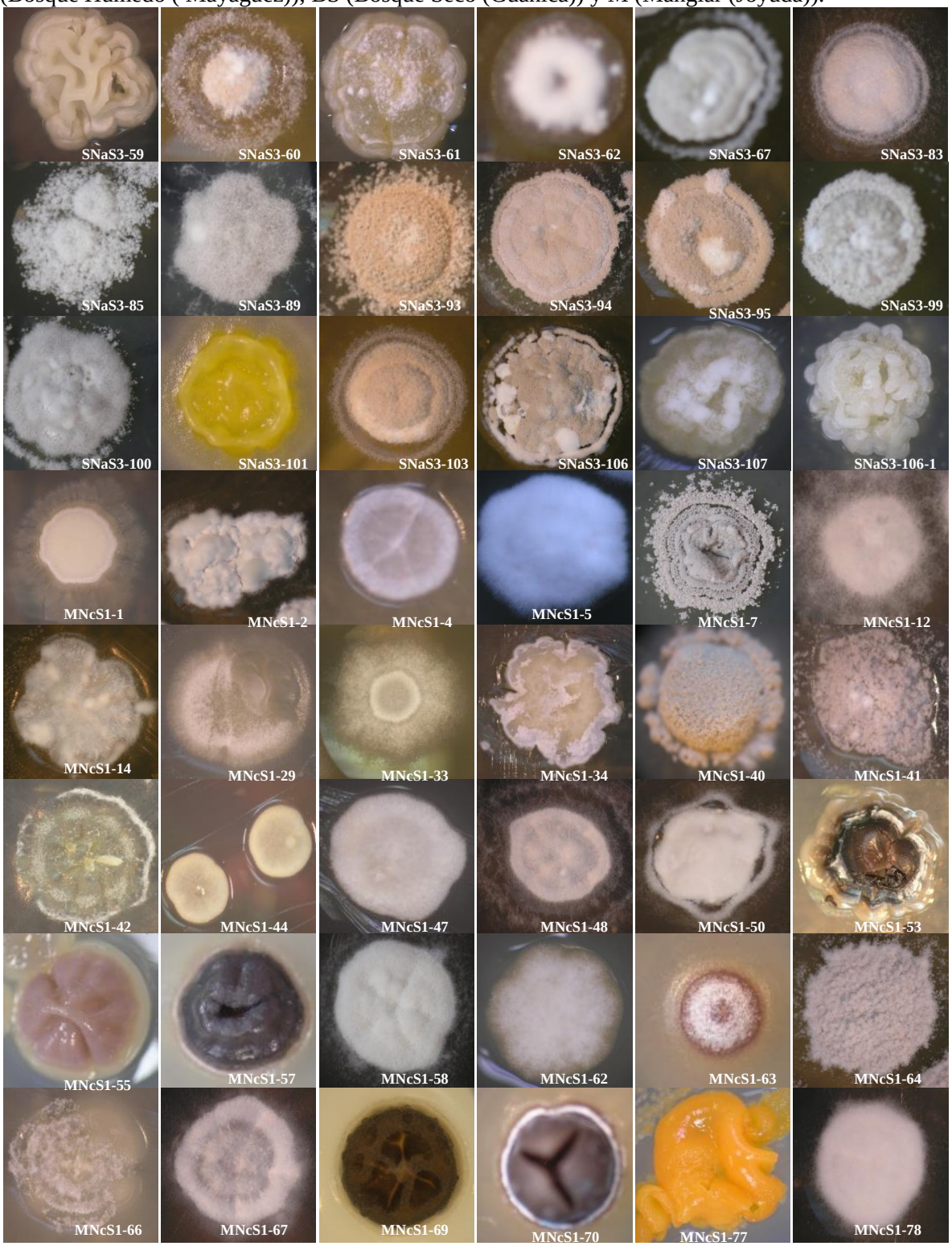
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



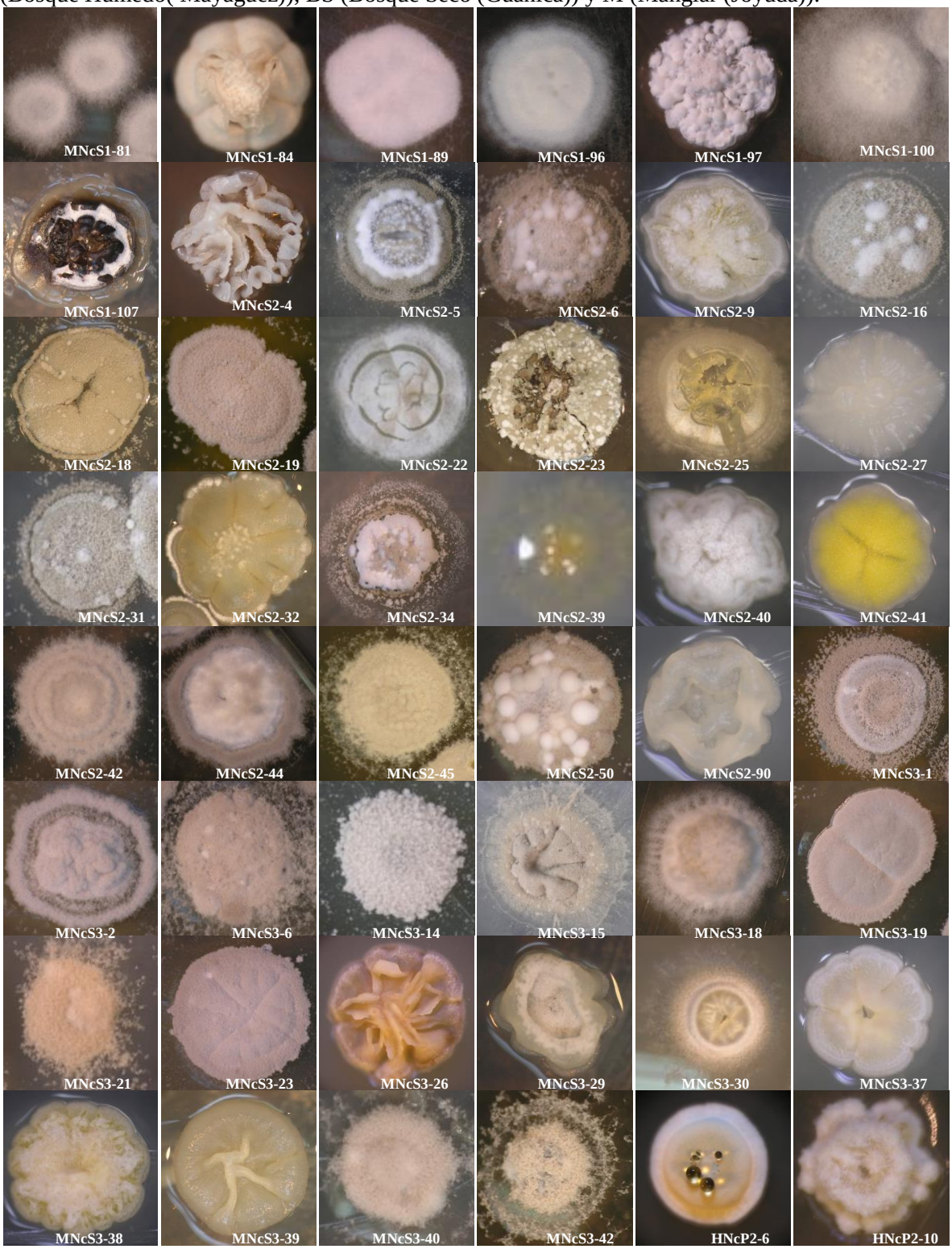
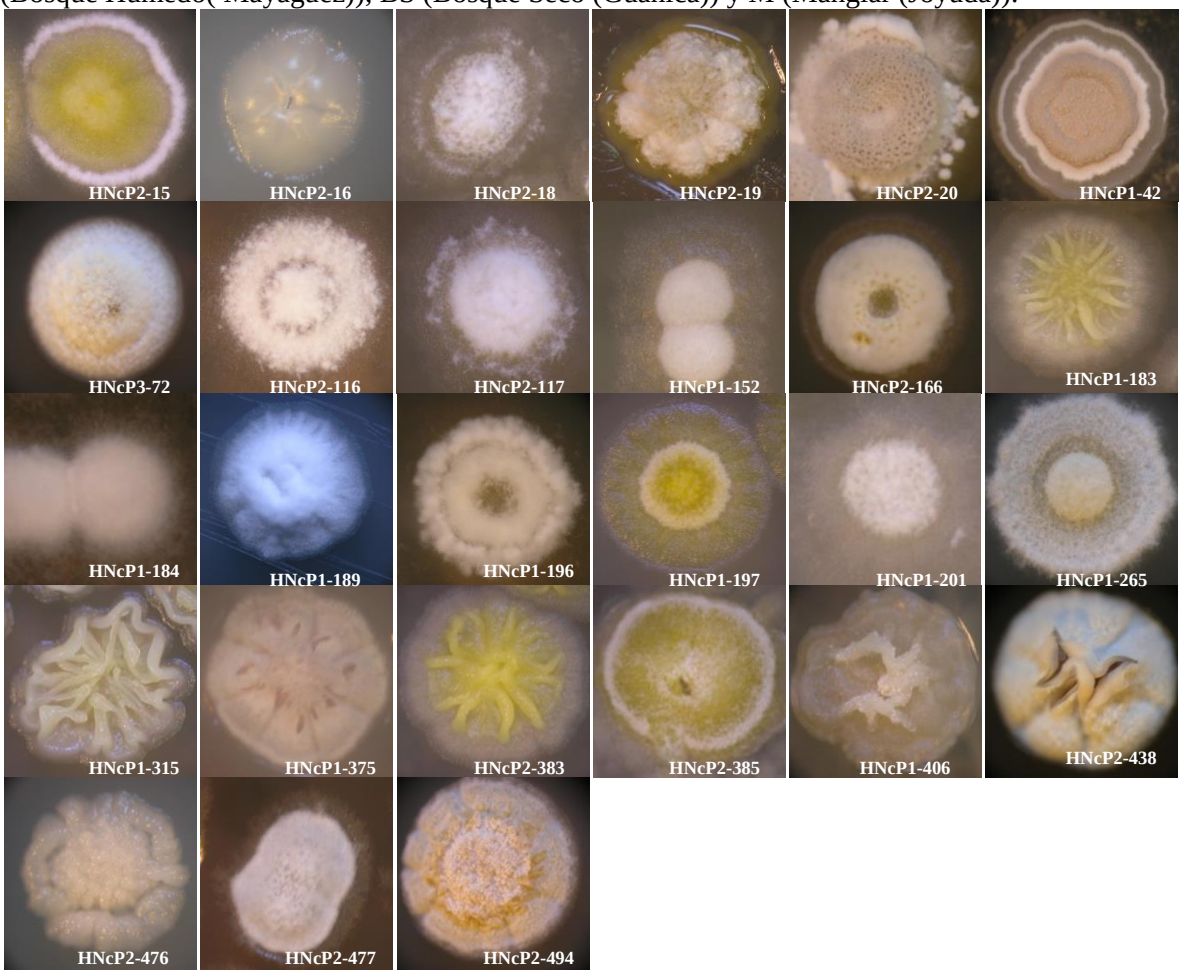
Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo (Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).



Apéndice 2. Fotografias de los morfotipos de colonias bacterianas del genero *Streptomyces* aislados de nidos de *Nasutitermes costalis* y *Nasutitermes acajutlae* en tres zonas ecológicas de Puerto Rico; BH (Bosque Húmedo(Mayaguez)), BS (Bosque Seco (Guánica)) y M (Manglar (Joyuda)).