

Caracterización de compuestos biocidas asociados a hormigas de la tribu attini

Carlos Sialer, Dina H. Horna, Carmen Méndez y José Salas

Introducción

Las hormigas cortadoras de hojas son un numeroso grupo de más de 230 especies que viven exclusivamente en América. Tienen un origen de más de 50 millones de años (Schultz y Brady, 2008) y han sido consideradas, junto a los humanos, el gorgojo descortezador y las termitas, los únicos grupos animales capaces de desarrollar la agricultura.

Solo las conocidas como attini superiores (géneros *Acromyrmex* y *Atta*) usan la materia vegetal que recolectan como compost para los hongos que cultivan “fungicultura” de la familia *Lepiotaceae* (agaricales). Los cuerpos fructíferos “gongilidias” constituyen la base nutritiva fundamental de la colonia “micofagia” (Currie *et al.*, 1999a y b; Mueller y Gerardo, 2002; Mueller y Rabelling, 2008). Debido a esto el papel parasitario de otro hongo *Escovopsis*, se traduce no solo como una amenaza para sus cultivos, sino también, para la colonia. La necesidad latente de protegerse tras su constante amenaza y controlar su proliferación en los cultivos de la colonia, ha influenciado al parecer en el desarrollo de una simbiosis mutualista múltiple con otros microorganismos como los actinomicetos (Taerum *et al.*, 2007), los cuales les brindan una elevada protección con un coctel de compuestos biocidas diversos y letales.

Las hormigas son un sustrato vivo rico en quitina. Los actinomicetos capaces de colonizar el exoesqueleto de las hormigas, provienen del suelo donde está establecida la colonia. Por lo tanto su diversidad tanto de géneros como especies está relacionada con su abundancia y proliferación en suelos ricos cuya materia orgánica es proporcionada por la actividad de la colonia. Por lo tanto, un constante intercambio y colonización de microorganismos que encuentran tanto en el suelo como en las hormigas condiciones adecuadas para su proliferación, se convierte en la clave para un alto nivel de evolución e intercambio de información genética que justificaría la diversidad de compuestos y actividad que hemos podido identificar.

Materiales y métodos

El material biológico proviene de 197 microorganismos aislados de hormigas cortadoras de hojas de 4 diferentes nidos pertenecientes a la especie *Acromyrmex octospinosus*. Los productos químicos empleados en la elaboración de tampones, medios de cultivo, reactivos en general y para la extracción e identificación de metabolitos secundarios fueron

los comúnmente recomendados para producción, extracción e identificación de compuestos bioactivos.

Se aplicó el proceso de dereplicación o *counterscreening*, prueba que tiene como fin hacer un reconocimiento y discriminación de aquellas sustancias que ya habrían sido estudiadas e identificadas diferenciadas de otras nuevas sustancias farmacológicamente activas presentes y mezcladas en extractos naturales. Para esto los extractos purificados fueron probados secuencialmente en paralelo con su separación cromatográfica por tiempos de retención hasta obtener el compuesto bioactivo completamente puro y diferenciado. Probándose su actividad biocida mediante bioensayos frente a microorganismos indicadores *Escherichia coli* ESSC, *Staphylococcus aureus* CECT N° 240 ATCC 6538P, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* TioR*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Candida albicans* además de enfrentar los extractos contra bacterias procedentes de muestras clínicas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y bioensayos contra líneas tumorales H729, A549, y MDA-MB-231, de acuerdo con las especificaciones de la guía de la NCL (Grever *et al.*, 1992).

Estos estudios se completaron con la secuenciación y análisis de la región del ADNr 16S de cada cepa, comprendida entre el nucleótido 84-280 de la secuencia del ADNr 16S de *Streptomyces coelicolor* (Ylihonko *et al.*, 2002). Con la posterior construcción de la filogenia de los microorganismos aislados.

Resultados

El análisis de los cromatogramas de los extractos de todos los aislamientos haciendo uso de cromatografía líquida de alta resolución HPLC/MS y UPLC-MS, ambos acoplados a espectrofotómetros de masas, y en conjunto con su nivel de actividad antagónica biocida frente a otros microorganismos como: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Candida albicans* y citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales como H729 (carcinoma de colon), A549 (adenocarcinoma pulmonar), y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) nos mostraron un abanico de diversos compuestos biocidas producidos por las cepas aisladas, tal como se muestra en la tabla 1.

Estos resultados considerados como características fenotípicas de producción, no mostraron correspondencia con su identidad filogenética cuyas características genotípicas obtenidas mediante un minucioso y comparativo estudio mediante técnicas moleculares y bioinformáticas, de las secuencias de la región gamma variable del 16S de sus ADN cromosómicos, nos revelaron que las especies identificadas no se correspondían en muchos de los casos con la información científica previamente descrita sobre producción de compuestos biocidas semejantes en microorganismos de la misma especie identificados en asociación con otros seres vivos o a partir de muestras de suelo.

Tabla 1
 Diversos compuestos identificados a partir de extractos de diferentes aislamientos microbianos y su correspondencia de presencia en los diversos nidos muestreados de la hormiga *Acromyrmex octospinosus*

Compuestos Identificados	Familias de compuestos	Cepas donde se encontraron	Nidos
Griseorodina A	antraquinona (PKS 2)	CS210	N4
Granaticina A	antraquinona (PKS 2)	CS014, 40	N1
WS-5995-C	antraquinona (PKS 2)	CS189	N4
Resistomicina	antraquinona (PKS 2)	CS31,65M,103,106b,107	N1 y N2
Resistoflavina	antraquinona (PKS 2)	CS31,65M,103,106b,107	N1 y N2
Tetracenomicina	antraquinona (PKS 2)	CS31,65M,103,106b,107	N1 y N2
Galtamicina	antracielinas (PKS 2)	CS048	N3
Mitramicina	ácidos aureólico (PKS 2)	CS030	N2
Cromomicina	ácidos aureólico (PKS 2)	CS030	N2
Concanamicina A	macrolidos (PKS 1)	CS237	N4
Loboporina	macrolidos (PKS 1)	CS006a,13,123,139,158, 166,177	N1 y N2
Faeriefungina	poliol polieno macrolidos (PKS 1)	CS206	N4
Maltofilina	tetracíclico macrolactano (PKS 1)	CS048,CS049	N3
Ikarugamicina	tetracíclico macrolactano (PKS 1)	CS027	N1
Pamamicina	macrodilactona(PKS 1)	CS117	N4
Colismicina	moléculas biperidínicas	CS027,CS040,CS149,CS213	N1 y N4
Heterobactina	hidroxibenzoxazol (NRPS)	CS013	N1
Aurantimicina	depsipeptido (NRPS)	CS182	N4
Valinomicina	ciclopepsipeptido (NRPS)	CS070	N4
Actinomicina D	heteropeptido (NRPS)	CS041,CS131	N1,N3
RP-1776	péptido cíclico(NRPS)	199,201,220	N4
Stenotricina	péptido (NRPS)	CS156	N1
Actifenol	glutamida alicíclico aromático	CS109,CS114,CS133,CS187	N4
Germicidina A	lactona	todas	todos
Prodigiosina	Pigmento tripirrólico	CS138,159,184, 206,211,	N1,N2 y N4
Sek15	pironas	CS31,65M,103,106b,107	N1 y N2
Elloxazina (Acta 2871-B)	aminofenoxazina	CS047	N3

Conclusiones

Las hormigas cortadoras de hojas, microbiológicamente podrían ser consideradas una fuente orgánica selectiva de la diversidad de actinomicetos presentes en el suelo. Tal y como lo demuestran estudios previos hechos en la microbiota de suelo, para los actinomicetos, en las hormigas el género más abundante correspondió a *Streptomyces*, aunque al hacer la búsqueda de homologías de las secuencias de la región gamma del ADNr 16S de las diferentes cepas aisladas, con las secuencias depositadas en base de datos GenBank/EMBL/DBJ, no se encontró porcentaje de correspondencia suficiente como para justificar su identificación genética con especies previamente identificadas. Esta diversidad de familias de compuestos identificados, solo corresponde a los extraíbles bajo condiciones hidrofóbicas, cuyas estructura molecular diversa exhibe un amplio rango de actividad biológica tal y como se demuestra en la tabla de resultados frente a otros organismos y líneas celulares. Estos resultados muestran claramente como muchas cepas aisladas desde hormigas cortadoras de hojas tienen capacidad para producir más de dos compuestos algunos de ellos con estructura molecular semejante, mientras que para otros casos fueron capaces de producir compuestos biocidas con estructuras moleculares completamente distintas.

Referencias

Cafaro y Currie

2005 *Can. J. Microbiol.* 51: 441-446.

Currie, *et al.*

1999a *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7998-8002.

1999b *Nature*. Vol. 398: 701-704.

Haeder *et al.*

2009 *PNAS*. Vol. 106. N° 12: 4742-4746

Kost *et al.*

2007 *Naturwissenschaften*. 94: 821-828

Taerum *et al.*

2007 *Proc. R. Soc. B* 274, 1971-1978

Mueller y Gerardo

2002 *PNAS*. Vol. 99. N° 24. 15247-15249

Mueller y Rabelling

2008 *PNAS*. Vol. 105. N° 14. 5287-5288.

Schultz y Brady,

2008 *PNAS*. Vol. 105. N° 14. 5435-5440