

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS PARA EL CONTROL DE INFECCIONES BACTERIANAS FARMACORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS FÚNGICAS DE HORMIGUEROS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

# **DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. ÁNGEL SAHID AGUILAR COLORADO

TUTOR Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHAVÉZ INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2025



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

#### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS PARA EL CONTROL DE INFECCIONES BACTERIANAS FARMACORRESISTENTES A PARTIR DE CEPAS FÚNGICAS DE HORMIGUEROS

# T E S I S PARA OPTAR POR EL GRADO DE

# **DOCTOR EN CIENCIAS**

# PRESENTA

# M. en C. ÁNGEL SAHID AGUILAR COLORADO

TUTOR **Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHAVÉZ** INSTITUTO DE QUÍMICA



Ciudad de México, marzo 2025

### JURADO

Miembros:

Dr. Leovigildo Quijano Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

### LUGAR DE REALIZACIÓN

Este trabajo de tesis se realizó en los Laboratorios 2-5, 2-6 y de Cultivo del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, sin número, alcaldía Coyoacán, código postal 04510, Ciudad de México, México.

Dr. José Alberto Rivera Chávez Asesor

M. en C. Ángel Sahid Aguilar Colorado Sustentante

### **CONGRESOS Y SIMPOSIOS**

### Modalidad cartel

La micobiota de las hormigas y sus nidos como acervo para la bioprospección de antibacterianos y antihiperglucémicos. 17a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. En Monterrey, Nuevo León, México, del 18 al 21 de mayo 2022.

Antibacterial compounds from fungi associated with ant nests. Congreso de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Conferencia Anual de Química Holandesa. En La Haya, Países Bajos, del 20 al 25 de agosto de 2023.

Cribado químico-biológico de la micobiota de hormigueros para el aislamiento de inhibidores de bacterias Gram negativas multirresistentes. Simposio Interno del Instituto de Química de la UNAM. En Ciudad de México, México, el 5 de diciembre de 2023.

Identificación de una base estructural para la inhibición de *Acinetobacter baumannii* multirresistente a partir de micromicetos relacionados con hormigas. 2do Simposio de Enfoques Sociales y Científicos para Afrontar la Resistencia a los Antimicrobianos. En Ciudad de México, México, el 22 de noviembre de 2024.

### Exposición oral

Bioprospección de hongos filamentosos aislados de hormigas y sus nidos, provenientes de Veracruz, México. 2do Simposio Iberoamericano de Mirmecología. Reunión virtual el 6, 7, 13 y 14 de mayo de 2023.

### PUBLICACIONES

### De divulgación

Aguilar-Colorado, Á. S.; Rivera-Chávez, J. Los actinomicetos: el laboratorio químico de las hormigas. Gaceta Digital del Instituto de Química-UNAM **2022**, 8 (19), 18-19.

#### De revisión

Aguilar-Colorado, Á. S.; Rivera-Chávez, J. Ants/Nest-Associated Fungi and Their Specialized Metabolites: Taxonomy, Chemistry, and Bioactivity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2023**, 33 (5), 901–923. <u>https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3</u>.

#### De investigación

Aguilar-Colorado, Á. S.; Morales-Jiménez, Jesús; Rivera-Chávez, J. Harnessing Molecular and Bioactivity Network Analysis to Prioritize Antibacterial Compound Isolation from Ant-Associated Fungi. *Phytochemical Analysis* **2025**. Publicación electrónica antes de su impresión. https://doi.org/10.1002/pca.3513.

### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca 885837 otorgada para la obtención del grado de Doctor y el financiamiento del proyecto CF-2019-263977.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) por el financiamiento de los proyectos IA207422 e IN224424. Así como al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por su apoyo para la exposición en un congreso internacional.

A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez por su orientación y apoyo en el diseño y la realización de esta tesis.

A los miembros del comité tutor, Dr. José Antonio Guerrero Analco y Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, por sus contribuciones a lo largo de las evaluaciones semestrales.

A los miembros del jurado, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda, Dr. Leovigildo Quijano y Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, por sus apreciadas observaciones a esta tesis.

Al Instituto de Química (IQ), su personal administrativo y su personal técnico. A la Química María de los Ángeles Peña González, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dra. María Isabel Chávez Uribe, Dra. María del Carmen García González, Dr. Francisco Javier Pérez Flores y la Dra. Adriana Romo Pérez, por la adquisición de la información espectroscópica, espectrométrica y polarimétrica. A la M. en I. Maricruz López López por su apoyo en el manejo de los residuos químicos y biológico infecciosos.

Al personal del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN-IQ-UNAM), Dra. Nuria Esturau Escofet y Dra. Beatriz Quiroz García, por la adquisición de la información espectroscópica.

Al personal del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC-IQ-UNAM), M. en C. Everardo Tapia Mendoza, por la adquisición de la información espectrométrica.

Al Dr. Jesús Morales Jiménez adscrito al Departamento de El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, por su apoyo en la determinación taxonómica de los hongos en estudio.

Al Dr. Jorge Ernesto Valenzuela Gonzáles y la Bióloga Dora Luz Martínez Tlapa adscritos al área de Ecología Funcional del Instituto de Ecología, A.C. (INECOL) y la Dra. Viridiana Vega Badillo curadora de la Colección Entomológica IEXA del INECOL por su colaboración para la determinación taxonómica, el montaje y el depósito de las hormigas en estudio.

Al Dr. Rodolfo García Contreras adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, por el donativo de las cepas bacterianas en estudio.

A la Dra. Corina Diana Ceapă responsable del Laboratorio de Microbiología del IQ, UNAM, por las facilidades en las instalaciones.

A la Q.F.B. María Fernanda Vargas Téllez y Q.F.B. Leslie Maribel Corona Cabello por la confianza depositada en mi trabajo como supervisor técnico de su tesis de licenciatura.

A los responsables del Santuario del Bosque de Niebla y el Parque Ecológico El Haya en Xalapa, los propietarios de la Hacienda El Trianón en Coatepec, el rancho El Águila y la finca Los Magueyes en Teocelo, ubicados en Veracruz, México, por las facilidades prestadas para la recolección de hormigas y muestras de tierra de hormigueros.

A la Fundación TELMEX-Telcel por la beca de rendimiento académico.

### **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Ángel Aguilar, David Aguilar y Flor Colorado, por su apoyo incondicional y motivarme sin límites.

A Rosa Angelica Gutiérrez por inspirarme constantemente y brindarme su ayuda durante todo el tiempo que hemos compartido.

A Agustín Aguilar, Carmen Cadillo, Herminia Aguilar e Irma Aguilar, por su continua presencia a pesar de la distancia.

A mis compañeros de laboratorio, por generar un entorno de trabajo respetuoso, íntegro y colaborativo.

A Adrián Mejía, Carlos Fajardo, Enrique Aguilar, Evelyn García, Ingrid Martínez, Ixchel Loa, Karol Carrillo y Rogerio Saavedra, por sus enseñanzas, consejos y su valiosa amistad.

A Ángeles Zavala, Fernanda Hernández, Fernanda Vargas, Leslie Corona y Mariana García, por la amistad que cultivamos a lo largo de nuestro paso por el laboratorio.

A Alberto Pardo, Alejandro Jacinto, Brandon Zacarías, Camila Chávez, Carlos Quezada, Carlos Velasco, Isela Romero, Itzel Rojas, Karen Yáñez, Mario Carreón, Mario Yair, Mónica Conde, Oyuky Reyes, Valeria Abogado y Víctor Cruz, por la agradable convivencia en el laboratorio.

A los profesionistas de diferentes niveles con quienes trabajé y colaboré, por contribuir a mi formación y creatividad académica.

### DEDICATORIA

A mi novia y mi familia.

JURADO	I
LUGAR DE REALIZACIÓN	1
CONGRESOS Y SIMPOSIOS	II
PUBLICACIONES	II
AGRADECIMIENTOS	
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE	VII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XIII
ABSTRACT	XV
RESUMEN	XVI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
La resistencia a los antimicrobianos (RAM)	3
Situación en México	6
Los metabolitos especializados	7
Antibacterianos de origen fúngico	
El microbioma de los insectos	9
Micobiota de las hormigas y sus nidos	
Metabolitos especializados	
JUSTIFICACIÓN	
HIPOTESIS	
OBJETIVOS	
MATERIALES Y MÉTODOS	
Equipos	
Disolventes y reactivos	
Recolección de hormigas y tierra	
Identificación de las hormigas	
Aislamiento de morfotipos fúngicos	
Identificación de los morfotipos fúngicos	
Cultivo y extracción a escala pequeña	
Cultivo y extracción a escala media	
Análisis metabolómico no dirigido	
Análisis por espectrometría de masas en tándem	
Análisis por redes moleculares e identificaciones promisorias	30

# ÍNDICE

Mapeo de la actividad de compuestos31
Determinación de la actividad antibacteriana
Patógenos
Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano
Determinación del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula
Estudio químico
Perfilamiento de la composición química
Aislamiento de compuestos y determinación químico estructural
Compuestos aislados de la cepa IQ-1129
Compuestos aislados de la cepa IQ-1038
Compuestos aislados de la cepa IQ-1017
Compuestos aislados de la cepa IQ-81941
Compuestos aislados de la cepa IQ-81445
Compuestos aislados de la cepa IO-807
Análisis estadísticos
Análisis estadísticos 47   RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 48   Hormigas y hormigueros bajo estudio 48   Colección de morfotipos fúngicos 49   Colección de extractos 51   Actividad antibacteriana 52   Análisis metabolómico no dirigido 54   Estudio químico. 60   Acerca de los compuestos aislados 64   Bioactividad de los compuestos aislados 66   CONCLUSIONES. 70   PERSPECTIVAS 70
Análisis estadísticos 47   RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48   Hormigas y hormigueros bajo estudio 48   Colección de morfotipos fúngicos 49   Colección de extractos 51   Actividad antibacteriana 52   Análisis metabolómico no dirigido 54   Estudio químico. 60   Acerca de los compuestos aislados 64   Bioactividad de los compuestos aislados 66   CONCLUSIONES. 70   PERSPECTIVAS 70   REFERENCIAS. 71

### LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de cultivo a escala media	. 29
Cuadro 2. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de 44 y 45	. 38
Cuadro 3. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de <b>46</b>	. 39
Cuadro 4. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de 47	. 40
Cuadro 5. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de <b>48</b>	. 43
Cuadro 6. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de <b>49, 50</b> y <b>51</b>	. 44
Cuadro 7. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de <b>52</b>	.46
Cuadro 8. Información de RMN <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de 53	. 47
Cuadro 9. Morfotipos mucoides aislados del suelo	. 50
Cuadro 10. Morfotipos filamentosos aislados del suelo	. 50
Cuadro 11. Morfotipos filamentosos aislados de hormigas	. 51
Cuadro 12. Inhibición del crecimiento de <i>A. baumannii</i> cepa A564	. 67

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cuota de mercado mundial al 2023 de los antibacterianos por familia química4
Figura 2. Mecanismos que median la resistencia de los patógenos ESKAPE5
Figura 3. Compuestos antibacterianos de actinobacterias provenientes de hormigueros 11
Figura 4. Sitios de los que se han aislado hongos en hormigueros13
Figura 5. Distribución de la micobiota levaduriforme en los hormigueros14
Figura 6. Distribución de la micobiota filamentosa en los hormigueros14
Figura 7. Compuestos inhibidores de <i>Escovopsis</i> spp. aislados de <i>Pseudonocardia</i>
Figura 8. Compuestos inhibidores de <i>Escovopsis</i> spp. aislados de <i>Streptomyces</i> 16
Figura 9. Moléculas aisladas de <i>Escovopsis</i> spp
Figura 10. Moléculas aisladas de hongos encontrados en el jardín fúngico de hormigueros 18
Figura 11. Moléculas aisladas de hongos asociados con hormigas y sus nidos19
Figura 12. Ubicación geográfica y vegetación de los puntos de recolección24
Figura 13. Puntos de recolección de tierra25
Figura 14. Ejemplos selectos de morfotipos aislados
Figura 15. Cromatogramas de las fracciones de mediana polaridad de algunos morfotipos 34
Figura 16. Compuestos aislados de IQ-1129
Figura 17. Compuesto aislado de IQ-1038
Figura 18. Morfotipo IQ-1017
Figura 19. Compuesto aislado de IQ-101740
Figura 20. Compuestos aislados de IQ-81942
Figura 21. Compuesto aislado de IQ-81445
Figura 22. Compuesto aislado de IQ-807
Figura 23. Clasificación taxonómica de las especies de hormigas recolectadas48
Figura 24. Clasificación de los morfotipos bioprospectados52
Figura 25. Inhibición del crecimiento bacteriano por los morfotipos bioprospectados53
Figura 26. Red molecular global de los morfotipos bioprospectados55
Figura 27. Atributos de los nodos y las aristas de la red molecular global
Figura 28. Compuestos presuntamente identificados en la red global58
Figura 29. Mapa de la inhibición del crecimiento de A. baumannii por los morfotipos59
Figura 30. Diagrama de dispersión de iones precursores presuntamente bioactivos60
Figura 31. Morfotipos seleccionados para su estudio químico
Figura 32. Inhibición del crecimiento de A. baumannii por las fracciones primarias61
Figura 33. Redes y nodos de los compuestos aislados63
Figura 34. Deoxiakantomicina (69)64
Figura 35. <i>N</i> -piridin-2-onas de origen natural65
Figura 36. Actividad antibacteriana de los compuestos 44 y 45 contra A. baumannii

### LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Localización de los nidos y hormigas recolectados	90
Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo	92
Anexo 3. Región ITS del ADN ribosómico de los morfotipos seleccionados	101
Anexo 4. Vistas microscópicas de los morfotipos	101
Anexo 5. Información sobre las identificaciones promisorias de los nodos	102
Anexo 6. Fraccionamiento del control del medio de crecimiento sólido	105
Anexo 7. Fraccionamiento secundario de la cepa IQ-819, IQ-814 e IQ-807	105
Anexo 8. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-1129	106
Anexo 9. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-1038	107
Anexo 10. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-819	108
Anexo 11. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-814	109
Anexo 12. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-807	110
Anexo 13. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 44	111
Anexo 14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 44	111
Anexo 15. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 44	112
Anexo 16. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 44	112
Anexo 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 45	113
Anexo 18. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 45	113
Anexo 19. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 45	114
Anexo 20. Espectro HMBC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 45	114
Anexo 21. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 46	115
Anexo 22. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 46	115
Anexo 23. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 46	116
Anexo 24. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 47	117
Anexo 25. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 47	117
Anexo 26. Espectro HSQC (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 47	118
Anexo 27. Espectro HMBC (700 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de 47	118
Anexo 28. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CD <sub>3</sub> (CO)CD <sub>3</sub> ) de 48	119
Anexo 29. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CD <sub>3</sub> (CO)CD <sub>3</sub> ) de 48	119
Anexo 30. Espectro HSQC (700 MHz, CD <sub>3</sub> (CO)CD <sub>3</sub> ) de 48	120
Anexo 31. Espectro HMBC (700 MHz, CD <sub>3</sub> (CO)CD <sub>3</sub> ) de 48	120
Anexo 32. Espectro COSY (700 MHz, CD <sub>3</sub> (CO)CD <sub>3</sub> ) de 48	121
Anexo 33. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 49	122
Anexo 34. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 49	122
Anexo 35. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 49	123
Anexo 36. Espectro HMBC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 49	123
Anexo 37. Espectro COSY (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 49	124
Anexo 38. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 50	125

Anexo 39. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 50	125
Anexo 40. Espectro HSQC (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 50	126
Anexo 41. Espectro HMBC (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 50	126
Anexo 42. Espectro COSY (700 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de 50	127
Anexo 43. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 51	128
Anexo 44. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 51	128
Anexo 45. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 51	129
Anexo 46. Espectro HMBC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 51	129
Anexo 47. Espectro HRMS-ESI+-QTOF de 52	130
Anexo 48. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	131
Anexo 49. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	131
Anexo 50. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	132
Anexo 51. Espectro HMBC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	132
Anexo 52. Espectro COSY (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	133
Anexo 53. Espectro NOESY (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 52	133
Anexo 54. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 53	
Anexo 55. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 53	
Anexo 56. Espectro HSQC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 53	135
Anexo 57. Espectro HMBC (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 53	135
Anexo 58. Inhibición de la formación de biopelícula de A. baumannii cepa A564	136
Anexo 59. Comprobantes de participación en simposios y congresos	
Anexo 60. Artículos publicados	

### **ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

J: Constante de acoplamiento en Hz

°C: Grado Celsius

- µg: Microgramo
- µm: Micrómetro
- µM: Micromolar.
- AcOEt: Acetato de etilo
- ACS: Sociedad Química Estadounidense (*American Chemical Society*)
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADP: Adenosín difosfato
- ASTM: Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (*American Society for Testing and Materials*)
- ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*)
- BLAST: Herramienta de búsqueda de alineación local básica (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- c: Señal cuádruple
- CD<sub>3</sub>(CO)CD<sub>3</sub>: Acetona deuterada
- CD<sub>3</sub>OD: Metanol deuterado
- CDCl<sub>3:</sub> Cloroformo deuterado
- CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución
- CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- cm: Centímetros
- cm<sup>2</sup>: Centímetro cuadrado
- CMB: Concentración Mínima Bactericida
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- COSY: Espectroscopía de correlación (*Correlation Spectroscopy*)
- d: Señal doble
- DART: Análisis directo en tiempo real (*Direct Analysis in Real Time*)
- DCM: Diclorometano
- DEPT: Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)
- dm: Decímetro
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DMSO-*d*<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado
- EM: Espectrometría de masas

- ESI: Ionización por electronebulización (*Electrospray Ionization*)
- EUA: Estados Unidos de América
- eV: Electronvolts
- g: Gramos
- GNPS: Red social molecular mundial de productos naturales (*Global Natural Product Social Molecular Networking*)
- h: Horas
- HMBC: Correlación heteronuclear a múltiples enlaces (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)
- HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*)
- HSQC: Correlación heteronuclear cuántica sencilla (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)
- Hz: Hertz
- ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)
- INECOL: Instituto de Ecología, A. C.
- IQ: Instituto de Química
- ITS: Espaciador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer*)
- Kg: Kilogramo
- kV: Kilovoltios
- m. s. n. m.: Metros sobre el nivel del mar
- *m*/*z*: Relación masa/carga
- m: Señal múltiple
- M<sup>+•</sup>: Ion molecular
- MeCN: Acetonitrilo
- MeOH: Metanol
- mg: Miligramo
- MH: Mueller Hinton
- min: Minutos
- mL: Mililitro
- MS/MS: Espectrometría de masas en tándem
- NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)
- ND: No determinado
- nm: Nanómetro

NOESY: Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) OMS: Organización Mundial de la Salud OSMAC: Una cepa, muchos compuestos (One Strain Many Compounds) PD: Papa-dextrosa PDA: Arreglo de fotodiodos (Photodiode Array) PM: Peso molecular ppm: Partes por millón q: Señal quíntuple QTOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo (Quadrupole time-of-flight) quint: Señal quíntuple RAM: Resistencia antimicrobiana RMN <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H: Resonancia magnética nuclear de carbono-13 e hidrógeno-1 rpm: Revoluciones por minuto. s: Señal simple o segundo sbp.: Señal sobrepuesta t: Señal triple TIC: Cromatograma de iones totales (Total Ion Chromatogram) TOF: Tiempo de vuelo (Time-of-flight) t<sub>R</sub>: Tiempo de retención en minutos UA: Unidades de absorción UAM: Universidad Autónoma Metropolitana UFC: Unidad Formadora de Colonia UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México UV: Ultravioleta vis: Visible  $\delta_c$ ,  $\delta_H$ : Desplazamiento químico en ppm de

carbono-13 e hidrogeno-1

#### ABSTRACT

Given the need to find antibacterial compounds that contribute to the development of treatments for human infections, especially those caused by Gram-negative bacteria, a collection of fungal morphotypes obtained from six species of ants, their nests and their surroundings, found on the soil of the cloud forest of Veracruz, Mexico and its modified areas was bioprospected. Thisecosystem that was selected because of its great biological richness and high humidity. Initially, 792 microscopic fungi associated mainly with Atta mexicana and Solenopsis geminata ants were isolated; however, only the organic extract of 252 randomly selected strains was considered. Fungi were prioritized for chemical investigation based on their ability to in vitro inhibit the growth of multidrug-resistant Acintobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae, as well as their chemical composition according to metabolomic analysis by molecular networks and presumptive identifications, which were supported by high-resolution spectrometric information. Moreover, chemistry was combined with bioactivity information using a compound activity mapping technique. As a result, 15 secondary metabolites classifiable mostly as polyketides and alkaloids were tentatively identified from the fungal collection. In addition, 10 compounds, one of which is mentioned for the first time, were isolated from Trichoderma, Clonostachys and *Cladosporium* isolates. The identity of all compounds was established by spectroscopic and spectrometric analyses, while their biological effect was additionally determined by bioassays. The capability of PF1140 (44) and deoxy-PF1140 (45) to inhibit A. baumannii growth at a minimum concentration of 11.0 and 31.6 µg/mL, respectively, as well as to decrease biofilm formation at lower concentrations was relevant. The reported bioactivity data represents one of the first approaches to explore the antibacterial capacity of the mycobiota of ants and their nests. Untargeted metabolomic analysis expands the available chemical information. This research revalues cloud forest soil fungi as a current source of bioactive compounds and provides an example of the importance of exploring atypical mycobiomes. The utilization of the isolated pyridin-2-ones should be continued.

#### RESUMEN

Ante la necesidad de encontrar compuestos antibacterianos que contribuyan al desarrollo de tratamientos para infecciones humanas, especialmente para las causadas por bacterias Gram negativas, se bioprospectó una colección de morfotipos fúngicos obtenidos a partir de seis especies de hormigas, sus nidos y los alrededores de estos, halladas en el suelo del bosque de niebla de Veracruz, México y sus áreas modificadas. Este ecosistema que fue seleccionado dada su gran riqueza biológica y alta humedad. Inicialmente, se aislaron 792 hongos microscópicos asociados principalmente a las hormigas Atta mexicana y Solenopsis geminata, sin embargo, únicamente el extracto orgánico de 252 cepas elegidas al azar fue considerado. La priorización para el estudio químico de los hongos tomó en cuenta su capacidad para inhibir in vitro el crecimiento de Acintobacter baumannii y Klebsiella pneumoniae multirresistentes, así como su composición química de acuerdo con análisis metabolómicos por redes moleculares e identificaciones presuntivas, que se sustentaron en información espectrométrica de alta resolución. Además, la información química se combinó con la de bioactividad mediante una técnica de mapeo de la actividad de compuestos. Como resultado, 15 metabolitos secundarios clasificables en su mayoría como policétidos y alcaloides fueron identificados tentativamente a partir de la colección fúngica. Adicionalmente, del estudio químico de seis hongos identificados como ascomicetos de los géneros Trichoderma, Clonostachys y Cladosporium se aislaron 10 compuestos, de uno de los cuales se hace la primera mención. La identidad de los compuestos fue establecida mediante análisis espectroscópicos y espectrométricos, al mismo tiempo que se determinó su efecto biológico por bioensayos. Fue relevante la capacidad de PF1140 (44) y deoxi-PF1140 (45) para inhibir el crecimiento de A. baumannii a una concentración mínima de 11.0 y 31.6 µg/mL, respectivamente, así como menguar la formación de biopelícula a concentraciones menores. Los datos de bioactividad que se reportan son uno de los primeros acercamientos al estudio de la capacidad antibacteriana de la micobiota de las hormigas y sus nidos, asimismo, los análisis metabolómicos no dirigidos amplían su información química disponible. Esta investigación revaloriza los hongos del suelo del bosque de niebla como una fuente vigente de compuestos bioactivos y constituye un ejemplo sobre la importancia de explorar micobiomas atípicos. El aprovechamiento de las piridin-2-onas aisladas debería continuarse.

### INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos sintetizan una variedad de compuestos químicos denominados metabolitos o productos naturales, clasificados de forma general en primarios o secundarios, los últimos también referidos como especializados. Los primeros incluyen a los carbohidratos, las proteínas, los ácidos grasos, las vitaminas y los ácidos nucleicos, que intervienen en funciones básicas celulares como el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. En cambio, los metabolitos especializados son moléculas de bajo peso molecular que poseen una amplia diversidad de estructuras, responsables de conferir a los seres vivos ventajas evolutivas y de adaptación al entorno, al mismo tiempo que son taxonómicamente restringidos y se biosintetizan a partir de metabolitos primarios.<sup>7</sup>

Uno de los grupos de organismos más diverso y extendido que biosintetizan metabolitos especializados son los hongos, pues se ha calculado que el reino Fungí podría reunir a casi 3.8 millones de especies y ser el segundo reino más grande.<sup>2</sup> No obstante, se conocen los constituyentes químicos de una reducida cantidad de hongos y, en consecuencia, el aprovechamiento de su acervo químico es limitado.<sup>3</sup> Al respecto, los metabolitos especializados ostentan una incomparable variedad de estructuras químicas con actividades biológicas útiles en medicina y muchos se han convertido en fármacos o en prototipos estructurales de los mismos.<sup>4</sup> En este sentido, la diversidad química de los metabolitos fúngicos puede explorarse a fin de contribuir al tratamiento de problemas de salud, como la resistencia a los antibióticos y la diabetes mellitus tipo II.<sup>5-7</sup> Uno de los hábitats rezagados desde el punto de vista de la composición química de su micobiota son los insectos, particularmente el de las hormigas cuya situación contrasta con la profundización química de sus actinobacterias asociadas.<sup>5,8,9</sup> Por otro lado, también hay ecosistemas cuya micobiota ha sido desaprovechada y se encuentra en peligro de desaparecer, tal es el caso del bosque mesófilo de montaña o bosque de niebla, que se caracteriza por una alta humedad, gran riqueza biológica y una distribución limitada que lo hace vulnerable a las actividades humanas.<sup>10,11</sup>

La resistencia a los antibacterianos es una de las mayores amenazas para la humanidad ya que hace mortales a infecciones agudas y crónicas comúnmente tratables. Actualmente, algunos de los patógenos resistentes más preocupantes son *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.<sup>12</sup> Entre las estrategias promovidas para su combate se contempla la necesidad

de investigar y desarrollar nuevos antimicrobianos.<sup>73</sup> En vista de todo lo mencionado, este proyecto propone la bioprospección de metabolitos secundarios a partir de hongos relacionados con hormigueros a fin de encontrar compuestos antibacterianos promisorios para combatir bacterias resistentes. Para lo cual, una colección de micromicetos aislados de hormigas y hormigueros encontrados en el suelo de áreas modificadas del bosque de niebla de Veracruz, México, fue cribado con el propósito de optimizar los recursos humanos y económicos involucrados. Algunos morfotipos fúngicos fueron seleccionados por su actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram negativas multirresistentes y su quimiotipo basado en análisis metabolómicos no dirigidos con datos espectrométricos. El estudio químico de los hongos elegidos condujo al aislamiento de una variedad de compuestos cuyo potencial antibacteriano fue determinado. Los resultados revalorizan los hongos del suelo, contribuyen a la información químico-biológica de la micobiota de las hormigas y posiciona a algunos compuestos como antibacterianos a seguir estudiándose.

#### **ANTECEDENTES**

#### La resistencia a los antimicrobianos (RAM)

Los antimicrobianos son medicamentos utilizados para tratar infecciones provocadas por bacterias, virus, parásitos y hongos, los cuales pueden desarrollar tolerancia a los tratamientos y entonces considerarse resistentes.<sup>74</sup>Una de las mayores preocupaciones es la resistencia a los antibacterianos o antibióticos, que se conoce desde 1924 cuando se informó la resistencia de *Treponema pallidum*, agente etiológico de la sífilis, al salvarsán.<sup>15</sup> Para 1940, el empleo de la penicilina inició la era dorada de los antibióticos, pero poco después la resistencia a la misma se convirtió en un inconveniente. Hoy en día, la RAM es un problema de salud pública ocasionado por el sobreuso, la prescripción inapropiada y la extensiva aplicación en la ganadería y la agricultura de los fármacos.<sup>12</sup> Adicionalmente, un microbio puede denominarse multirresistente cuando de forma adquirida ha perdido la sensibilidad a más de un fármaco, sin embargo, debido a la falta de una definición estandarizada se han propuesto tres niveles: la multirresistencia, que se entiende como la insensibilidad a mínimo un compuesto de tres familias farmacológicas; la resistencia extendida, cuando el patógeno únicamente es sensible a por lo menos un antibiótico de una o dos categorías y la panresistencia, cuando se es insensible a todos los fármacos disponibles.<sup>16</sup>

Entre 1940 y 1960 cerca de 16 clases de compuestos antibacterianos fueron descubiertos a partir de fuentes naturales, semisintetizados o totalmente sintetizados; podemos mencionar a los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos, las penicilinas, las cefalosporinas, las sulfonas y las quinolonas. Posteriormente, otras seis clases de compuestos como los carbapenémicos y los lipopéptidos fueron reportados al 2023.<sup>17,18</sup> Cabe señalar que, para fines comparativos, los antibióticos se denominan de espectro amplio o limitado en la medida en que afecten a un grupo mayor o menor de especies patogenas.<sup>19</sup> Actualmente, aunque la eficacia en ciertos casos está comprometida por la RAM varios de los antibióticos mencionados siguen empleándose (**Figura 1**).<sup>20</sup> Los antibióticos atacan bioquímica o estructuralmente a las células bacterianas para limitar su crecimiento o provocar su muerte, llamándose de forma correspondiente bacteriostáticos o bactericidas; los mecanismos de acción pueden consistir en la alteración de la membrana plasmática o la inhibición de la síntesis de la membrana, de la pared celular, de proteínas biosintéticas, de ácidos nucleicos o del metabolismo del ácido fólico, más otras vías en el caso de los antituberculosos.<sup>17,27</sup> No obstante, las bacterias pueden adquirir

resistencia endógenamente, por un proceso de mutación y selección natural tras exponerse a los antimicrobianos, o de forma exógena al tomarla de otras bacterias mediante la transmisión horizontal de genes; un ejemplo de estos elementos genéticos móviles es el gen blaNDM-1, codificante para una enzima carbapenemasa, cuya transferencia medida por plásmidos confiere resistencia a los carbapenémicos en varias especies de *Enterobacteriaceae*.<sup>21,22</sup> Algunos de los mecanismos de resistencia pueden radicar en la inactivación enzimática del antibiótico, la mutación o la sobrexpresión de los sitios diana, reducir su concentración intracelular o reducir la absorción del fármaco (**Figura 2**).<sup>18</sup>



Adaptado de Zhgun (2023).<sup>20</sup>



Los microorganismos resistentes amenazan la salud humana, animal y vegetal, pues en los humanos provocan infecciones difíciles de tratar, más largas y letales, al mismo tiempo que son un riesgo para la inocuidad y la seguridad de los alimentos y del medio ambiente. Además, la RAM genera pérdidas económicas debido al menoscabo de la productividad y el incremento de los costos de los tratamientos. <sup>74,23</sup> En el 2021 se calculó que 21.7 millones de personas en el mundo murieron por sepsis de forma directa o concurrente con otro padecimiento; las infecciones bacterianas provocaron 7.7 millones de esos decesos, de los cuales 5.8 millones se atribuyeron a bacterias resistentes.<sup>24,25</sup> Por otro lado, sin acciones para contrarrestarlo se espera que los decesos atribuibles a la RAM alcancen anualmente los 10 millones en 2050, acompañados de pérdidas económicas por 100 billones de dólares; situación que podría agravarse debido al cambio climático.<sup>26,27</sup> Las bacterias resistentes responsables de la mayoría de los fallecimientos se han agrupado y denominado ESKAPE por: *E. faecium, S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp.<sup>28</sup> Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una clasificación de 15 patógenos en tres niveles de atención prioritaria, de acuerdo

con su mortalidad, incidencia, transmisibilidad, tratabilidad y otros criterios. Los cuatro patógenos de prioridad crítica son *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, *Enterobacter* spp. resistentes a cefalosporinas de tercera generación y resistentes a carbapenémicos, así como *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina.<sup>29</sup>



Cada cuadrante reúne algunos ejemplos, señalados con viñetas, de los mecanismos de resistencia. LPS: lipopolisacárido. Adaptado de De Oliveira y colaboradores (2020).<sup>30</sup>

Figura 2. Mecanismos que median la resistencia de los patógenos ESKAPE

Afrontar la RAM requiere de un enfoque que integre diferentes perspectivas y actores, como se ha propuesto en un plan mundial de la OMS bajo el concepto de "Una sola Salud". En este sentido, las acciones que principalmente se han implementado para combatirla son la concientización acerca de la RAM, reforzar la vigilancia epidemiológica, desarrollar nuevos tratamientos, reducir la incidencia de las infecciones, utilizar de manera óptima los antibióticos disponibles y favorecer la inversión sostenible en estos objetivos.<sup>13,14,23</sup> México oficializó estas directrices en 2018.<sup>37</sup> Algunas terapias en investigación que pueden mencionarse son las basadas en bacteriófagos, la modulación inmunitaria, los anticuerpos, el reposicionamiento de fármacos, los probióticos, las nanopartículas y la terapia combinatoria.<sup>21,32</sup> En cuanto a la necesidad de nuevos compuestos bioactivos, preferiblemente multiobjetivo, y otros mecanismos de acción, se sabe que el problema fue agravado debido al abandono de su descubrimiento, investigación y desarrollo después de 1960, propiciado por los elevados costos y las estrictas regulaciones que todavía conllevan.<sup>18,33</sup> Conjuntamente, el desplazamiento en las últimas dos décadas de las ventas de antibióticos hacia los medicamentos genéricos ha desincentivado el financiamiento privado para más tratamientos.<sup>34</sup>

#### Situación en México

Las estimaciones desde 1990 indican un aumento constante de los decesos provocados por enfermedades infecciosas en México. De estas, para el 2021 se calculó que las causadas por bacterias representaron el 24% o 102,462 casos; las muertes relacionadas con infecciones por bacterias resistentes fueron de forma directa 16,134, más 66,541 en las que se conjuntó con otros padecimientos. El 87.7% de los decesos exclusivamente provocados por bacterias resistentes se debieron a *Escherichia coli, S. aureus, A baumannii, K. pneumoniae, P. aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.<sup>24,25</sup>

En cuanto a la vigilancia epidemiológica, para el año 2010 ya se había reportado el aislamiento de patógenos ESKAPE y *M. tuberculosis* resistente, a partir de pacientes con infecciones adquiridas en hospitales o en la comunidad.<sup>35</sup> Desde entonces, una variedad de estudios ha tratado la susceptibilidad antibacteriana y su tendencia a partir de aislados clínicos de varios centros hospitalarios;<sup>36-40</sup> a la vez que otros se han enfocado en rastrear patógenos particulares como *S. aureus*,<sup>41</sup> *K. pneumoniae*<sup>42</sup> y *A. baumannii*.<sup>43</sup> Uno de los reportes más recientes a partir de urocultivos y hemocultivos de 56 instituciones en 14 estados del país, destacó el incremento de los aislamientos de bacterias resistentes entre 2017 y 2022.<sup>44</sup> Podemos precisar el aumento de

*E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *P. aeruginosa* panresistente y *A. baumanni* multirresistente, las primeras tres halladas particularmente en pacientes bajo cuidados intensivos y la última en hospitalizados; también el lento crecimiento de la resistencia a la colistina favorecida por el mercado negro y un continuo desconocimiento sobre la resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* y *Clostridioides difficile.*<sup>44-46</sup> Desafortunadamente, se ha considerado que las medidas adoptadas para evitar el aumento de la RAM han tenido poco impacto.<sup>44</sup>

Sobre el consumo de antibacterianos, se ha encontrado que en los hospitales de tercer nivel los más prescritos son de uso sistémico, principalmente los de espectro extendido, y que desacertadamente, los tratamientos pueden tener bases muy empíricas, sin proveer su duración o fechas de revisión.<sup>47</sup> En general, los más usados en hospitales son las cefalosporinas, los carbapenémicos y la vancomicina. Además, cada vez se emplean más los costosos y no siempre disponibles fármacos de reserva.<sup>44</sup>

#### Los metabolitos especializados

Los metabolitos secundarios o especializados son moléculas sintetizadas por los seres vivos, producto de la evolución durante millones de años del metabolismo. Confieren ventajas evolutivas al organismo que los produce en relación con su ecosistema, aunque en algún momento se les consideró erróneamente no esenciales; en general, cumplen funciones de defensa, comunicación y competencia contra otros seres vivos.<sup>7</sup> Los metabolitos especializados son sintetizados a partir de bloques de construcción mediante las rutas metabólicas del acetatomalonato, del ácido shikímico, del mevalonato y del metileritritol fofato, así como una combinación de ellas. Entre las familias de compuestos podemos mencionar a los policetidos, los fenilpropanoides, los terpenos, los esteroides, los alcaloides y los glicósidos.<sup>48</sup>

El empleo medicinal de ciertas plantas y hongos desde la antigüedad se ha explicado por la actividad farmacológica de sus metabolitos secundarios.<sup>1</sup> Hoy en día, muchos metabolitos son fármacos de manera directa o como derivados semisintéticos, también están presentes en preparados herbolarios y han inspirado los farmacóforos de varios medicamentos.<sup>4</sup> Adicionalmente, desplazan a los pesticidas de síntesis en la agricultura orgánica.<sup>49,50</sup> Estas moléculas son un recurso útil para el descubrimiento de prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos, debido al tamaño de su espacio químico y la complejidad estructural que alcanzan.<sup>51</sup> Asimismo, aventajan por su capacidad innata para interactuar con dianas

moleculares y su biodegradabilidad.<sup>52</sup> Se especula que el número de metabolitos conocidos puede superar el medio millón y los bioactivos van de 200,000 a 250,000.<sup>53,54</sup> Cabe destacar el caso de los microorganismos, cuyo genoma está formado en un 75% por clústeres de genes biosintéticos silentes, los cuales podrían dar lugar a metabolitos crípticos valiosos.<sup>55,56</sup>

El descubrimiento de moléculas bioactivas comúnmente implica la selección de una fuente prometedora, su recolección o fermentación a mayor escala, el fraccionamiento de un extracto y la identificación de los compuestos con actividad biológica.<sup>57</sup> No obstante, se dispone de estrategias adicionales como el aislamiento de cepas por chips microfluídicos, los estudios químicobiodirigidos, el cribado de alto rendimiento, "una cepa, muchos compuestos" u OSMAC, las fermentaciones sumergidas, los cocultivos, los análisis metabolómicos, la desreplicación, la espectrometría de masas de imagen, la minería genómica y la expresión heteróloga de clústeres biosintéticos.<sup>18,52,57</sup> En 2023 casi el 80% de los compuestos descubiertos a partir de hongos se llevó a cabo por técnicas convencionales, seguido del 10% con estrategias basadas en redes moleculares.<sup>58</sup>

#### Antibacterianos de origen fúngico

Una de las aplicaciones principales de los metabolitos especializados es como medicamentos antimicrobianos, en conjunto con los antitumorales y los tratamientos para enfermedades metabólicas.<sup>59</sup> Sin embargo, solo una porción pequeña de los antimicrobianos descubiertos se convierten en fármacos, pues se conocen cerca de ~ 66,060 metabolitos bioactivos, pero en la actualidad únicamente hay ~ 100 principios activos en uso; que se aislaron en su mayoría de actinobacterias, hongos microscópicos (o micromicetos) y basidiomicetos.<sup>53,60</sup> En general, los microorganismos son una fuente prometedora de antibióticos debido a que habitan nichos muy competitivos, como el suelo, en los que estas moléculas cumplen una función natural defensiva, ofensiva o de señalización, intraespecífica o interespecífica, que les permite sobrevivir.<sup>55,61</sup>

Hasta el 2023 se habían desarrollado 22 clases de antibacterianos, cuatro de las cuales son de origen fúngico: las penicilinas, las cefalosporinas, las pleuromutilinas y el ácido fusídico, descubiertos en 1929, 1948, 1951 y 1958, respectivamente. A los que se suman las enniatinas, introducidas en 1963 y retiradas del mercado en 2016. Sus estructuras químicas se caracterizan por tener un anillo β-lactamico unido a un anillo tiazolidínico o dihidrotiacínico, ser diterpenoides tricíclicos, tener una base estructural esteroidea o ser depsipéptidos cíclicos. Especies como *Penicillium chrysogenum, Fusidium coccineum, Fusarium lateritium, Acremonium chrysogenum* 

y *Pleurotus mutilus* biosintetizan algunas de las moléculas de estas familias; tratándose todos de hongos filamentosos.<sup>55</sup> Entre sus mecanismos de acción destacan la inhibición de la síntesis o la disrupción de la membrana plasmática y el bloqueo de la síntesis proteica, por unión al factor G de elongación peptídica o a la subunidad ribosomal 50s.<sup>55</sup> Aunque el último antibiótico de origen fúngico llegó al mercado en 2007, la bioprospección a partir de este tipo de compuestos no ha cesado dado que cuentan con propiedades fisicoquímicas deseables y núcleos estructurales exclusivos.<sup>62-64</sup> En la literatura se ha informado acerca de varios metabolitos y extractos antibacterianos obtenidos de hongos de origen marino y terrestre, por ejemplo, del suelo marino<sup>65</sup>, de cenotes<sup>66</sup> y de manglares<sup>67,68</sup>; en muchos casos bioactivos contra patógenos multirresistentes.<sup>64,69-71</sup> Entre los compuestos reportados hay derivados del ácido benzoico, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, merotepernos, alcaloides, péptidos, esteroides y otros; las estadísticas del 2023 reflejan que los policétidos son la familia química más común de moléculas antibacterianas que se publica.<sup>56,64</sup>

#### El microbioma de los insectos

Motivados por la necesidad de comprender la diversidad biológica y beneficiarse del potencial biotecnológico de los seres vivos de tamaño microscópico, la humanidad ha sometido una variedad de lugares al escrutinio de las bacterias, las arqueas, los protozoos, las microalgas, los micromicetos (o microhongos) y otros organismos que los habitan.<sup>72,73</sup> Sin embargo, una gran parte de los espacios continúan inexplorados dado el tamaño de la Tierra y la cantidad de especies que los microbios representan, aun con el advenimiento de la metagenómica, que facilita la identificación de especies a través de marcadores genéticos.<sup>74–76</sup> Estimaciones recientes colocan a los insectos como uno de los mayores reservorios de microorganismos, de acuerdo con el sondeo de una variedad de sus taxones y en virtud de ser uno de los grupos de animales más diversos del planeta.<sup>74,76,77</sup>

Los insectos componen hasta el 85% del filo *Arthropoda*, al mismo tiempo que los artrópodos son el filo de animales más grande y es el reino *Animalia* quien agrupa al 70.9% de todas las especies conocidas.<sup>78</sup> De una manera muy general, los insectos son animales invertebrados, de cuerpo segmentado, exoesqueleto y apéndices articulados.<sup>79</sup> Se conocen 995,231 especies de insectos clasificados en 44 órdenes, de los que podemos mencionar por su contribución a *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* e *Hymenoptera*, denominados comúnmente escarabajos, moscas, mosquitos, mariposas, polillas, abejorros y avispas, por mencionar algunos ejemplos.<sup>80,81</sup> Las

comunidades microbianas de una variedad de insectos como termitas<sup>82-84</sup>, abejas<sup>85-87</sup> y arañas<sup>88</sup> han sido investigadas, llegándose a describir de forma individual o en su conjunto como influyen de en los procesos fisiológicos, el comportamiento y la ecología de los insectos; aunque la bacteriobiota y los hongos entomopatógenos ha recibido especial atención. Con frecuencia se estudian sus intestinos, su exoesqueleto y los espacios que habitan como capullos, galerías o nidos.<sup>89,90</sup> Desde hace años, los productos naturales de su microbioma han resultado de interes.<sup>91-93</sup>

Entre los insectos cuyo microbioma se ha tratado están las hormigas, animales eusociales clasificados en la familia Formicidae y del que se cuentan con 10,213 especies. En México se hallan 887 especies, 95.5% de las cuales son nativas; casi la mitad de los registros corresponden a Chiapas y Veracruz.<sup>80,94</sup> Las hormigas viven en casi todos los ambientes terrestres, a excepción de la Antártida, Islandia, Groenlandia y las islas del Pacifico central; son uno de los conjuntos más abundantes de la macrofauna edáfica, asentándose dentro de ramas, en madera muerta, debajo de la hojarasca, bajo las rocas y la minoría anidan en el suelo.<sup>95</sup> Los microorganismos más investigados asociados con estos insectos son las actinobacterias y los hongos, de los que se han identificado simbiontes que fungen como alimento, material de construcción y productores de metabolitos de defensa.<sup>91,96,97</sup> Por ejemplo, el estudio químico de Streptomyces spp. y Pseudonocardia spp. provenientes de la cutícula de hormigas fungicultoras del género Atta ha llevado al aislamiento de varios antifúngicos, usados por las hormigas como sanitizantes para contrarrestar la infección de sus cultivares fúngicos por otros hongos, particularmente *Escovopsis* spp.<sup>98</sup> En lo que concierne a la búsqueda de metabolitos antibacterianos, también a partir de actinobacterias se aislaron la nocamicina V<sup>99</sup>(1), GE37468<sup>100</sup>(2), la griseorhodina A<sup>101</sup>(3), la griseorhodina C<sup>101</sup> (**4**) y ECO-0501<sup>102</sup> (**5**; **Figura 3**).



Figura 3. Compuestos antibacterianos de actinobacterias provenientes de hormigueros

### Micobiota de las hormigas y sus nidos

Las investigaciones acerca de los micromicetos de las hormigas y hormigueros han cubierto apenas una parte de la diversidad esperada, en virtud del gran número de especies de estos insectos, la variedad de estilos de vida que llevan, su distribución en muchos ecosistemas y las limitaciones técnicas para abordarlo, por ejemplo, hay hormigas seminómadas llamadas "guerreras" o "legionarias" que anidan como grupos de hormigas vivas entrelazadas entre sí.<sup>*9,103</sup>* Al presente, para conocer las poblaciones microbianas de muestras ambientales se emplean métodos de aislamiento microbiológico y la metagenómica, esta última consiste en la estimación de índices de biodiversidad con base en los datos genéticos obtenidos por técnicas de secuenciación masiva. No obstante, el aislamiento en medios de cultivo está limitado a los microbios viables bajo condiciones de laboratorio y la metagenómica, aunque es exhaustiva en cuanto a la diversidad que registra, no provee de un cepario.<sup>*9*</sup> Sobre los microorganismos no cultivables, se ha informado de endosimbiontes intracelulares, gammaproteobacterias en</sup>

hormigas "carpinteras" del género *Camponotus* y *Wolbachia* spp. en hormigas "tortuga" del género *Cephalotes*.<sup>104,105</sup> La población fúngica de los hormigueros puede dividirse de forma general en los unicelulares o levaduras y los filamentosos o pluricelulares.

Un caso particular son los hongos filamentosos melanizados denominados "levaduras negras", del orden *Chaetothyriales*, asociados con hormigas arborícolas. Estos habitan naturalmente dentro de estructuras llamadas domatia, que ciertas plantas tienen para alojar a las hormigas, o fungen directamente como el material de construcción o cartón con que se arma el nido. En el primer caso predominan una variedad de los hongos clasificados en el clado Domatia y en el segundo los de las familias *Trichomeriaceae, Cyphellophoracere* y *Herpotrichiellaceae*.<sup>106,107</sup> Al respecto, los hongos *Chaetothyriales* son reconocidos oligótrofos y patógenos humanos.<sup>108</sup>

Para los nidos en el suelo, los sitios investigados han sido el cuerpo de las hormigas y la parte exterior e interior de sus nidos, estos últimos varían en estructura y de ello depende la forma del montículo y el tipo de cámaras que lo componen (**Figura 4**). Al 2023 las investigaciones disponibles analizaron mayoritariamente nidos de hormigas de la tribu *Attini* de algunos países de América Central y del Sur, principalmente Brasil, Estados Unidos de América (EUA) y Canadá. Se han estudiado 34 especies de hormigas de 13 géneros distintos, principalmente del género *Acromyrmex* y *Atta*, en consecuencia, casi el 99.7% de las especies de hormigas en el mundo permanecen sin registros. La identificación molecular y en menor medida la morfológica de los hongos, se puede resumir en 229 géneros con 120 especies filamentosas y 53 géneros con 131 especies levaduriformes.<sup>9</sup>



Imágenes tomadas de Sosa y colaboradores (2015).<sup>109</sup>



En cuanto los nidos en el suelo, casi el 50% de las especies de levaduras halladas se acumulan en los géneros *Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Trichosporon* y *Hannaella,* clasificadas mayoritariamente en el subfilo de *Saccharomycotina.*<sup>9</sup> El orden hallado con más frecuencia al interior de los nidos de hormigas fungicultoras es *Saccharomycetales* y a nivel de género lo son *Aureobasidium, Candida, Papiliotrema, Starmerella* y *Sugiyamaella*; asimismo, se han identificado algunas "levaduras asesinas".<sup>110</sup> Por otra parte, la diversidad de hongos filamentosos se ve representada principalmente por los géneros *Trichoderma, Penicillium* y *Aspergillus*, que contribuyen con casi el 25% de los registros para este tipo de hongos a partir de hormigueros. Sin embargo, la diversidad de géneros representados por solo una especie es poco más de la mitad del 75% restante (42.7%). Las subdivisiones fúngicas más comunes son *Pezizomycotina* y *Agaricomycotina*, que incluyen a la mayor parte de los ascomicetos y basidiomicetos.<sup>9</sup> A nivel de genero podemos destacar a los hongos entomopatógenos de los géneros *Iti* 

Gracias a las investigaciones que se han dado a la tarea de comparar la diversidad fúngica al exterior e interior de los hormigueros a nivel del suelo se observó que esta tiende a ser mayor en cuanto a especies únicas el interior, tanto para hongos levaduriformes como filamentosos (**Figura 5** y **Figura 6**).<sup>*g*</sup> Se ha informado que la estructura de la comunidad fúngica varia incluso entre colonias de la misma especie de hormiga, sin embargo, el estado de conservación de los sitios donde se hallan las colonias no provoca cambios.<sup>110,112</sup>



En paréntesis de indica el número (> 1) de especies de hongos distintas por género. Modificado de Aguilar-Colorado y Rivera-Chávez (2023).<sup>9</sup>



En paréntesis de indica el número (> 1) de especies de hongos distintas por género. Modificado de Aguilar-Colorado y Rivera-Chávez (2023).<sup>*g*</sup>

Figura 6. Distribución de la micobiota filamentosa en los hormigueros

En cuanto a la interacción del microbioma en los hormigueros. Se conjetura que en el caso de las hormigas fungicultoras de los géneros *Atta, Apterostigma, Acromyrmex, Cyphomyrmex* y *Trachymirmex*, los metabolitos antifúngicos biosintetizados por sus simbiontes de los géneros *Streptomyces*<sup>113-115</sup> y *Pseudonocardia*<sup>116,117</sup> podrían participar en el modelaje de la micobiota al interior de los nidos. Se ha probado que los simbiontes producen inhibidores del hongo parásito *Escovopsis* sp., sin embargo, su efecto es inespecifico.<sup>118</sup> De *Pseudonocardia* podemos mencionar a la dentigerumicina<sup>119</sup> (6), dentigerumicina F<sup>120</sup> (7) y attinimicina<sup>8</sup> (8; Figura 7), mientras que de *Streptomyces* se ha aislado la candicidina C<sup>121</sup> (9), nigericina<sup>122</sup> (10), dinactina<sup>122</sup> (11), mer-A2026B<sup>122</sup> (12), piericidina-A<sub>1</sub><sup>122</sup> (13), cyphomicina<sup>123</sup> (14), caniferolida C<sup>123</sup> (15) y GT-35<sup>123</sup> (16, Figura 8).



Figura 7. Compuestos inhibidores de Escovopsis spp. aislados de Pseudonocardia



Figura 8. Compuestos inhibidores de *Escovopsis* spp. aislados de *Streptomyces*
#### Metabolitos especializados

La información disponible demuestra la capacidad de esta micobiota para biosintetizar una variedad de familias químicas, llegándose en algunos casos a conjeturar una función natural de las moléculas a partir de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Todos los hongos que se han estudiado son filamentosos, la mayoría de los cuales están asocian con hormigas *Atta.*<sup>9</sup> En cuanto a la minería genómica, se predijo un clúster de genes biosintéticos para alcaloides y dicetopiperazinas en una cepa de *Escovopsis weberi.*<sup>124</sup> También se han identificado metabolitos de forma presuntiva a través de datos espectrométricos.<sup>124,125</sup>

Uno de los géneros más estudiados es Escovopsis (Figura 9) debido al interés en su papel como hongo patógeno de Leucoagaricus spp., un simbionte que habita en el interior de los nidos de las hormigas Atta.<sup>9</sup> Del cultivo axénico de Escovopsis weberi en medio de harina de soja se aislaron cinco triterpenos indólicos de tipo shearinina (17-19, 21, 22), la emodina (20) y la cicloartropsona (23), determinándose que la shereanina L (21) disminuye in vivo el forrajeo de la hormiga Acromyrmex octospinosus, así como que 20 y 23 inhiben el crecimiento del simbionte Leucoagaricus gongylophorus en ensayos de difusión en agar.<sup>126</sup> El policétido lineal conocandina B (24) y su derivado la conocandina C (26), se aislaron de una cepa de *Escovopsis* proveniente de un nido de Trachymyrmex sp. del Amazonas, que se cultivó en caldo de extracto de levadura y malta. En experimentos in vitro el compuesto 24 inhibió el crecimiento de varias cepas de *Pseudonocardia* sp., otro simbionte de hormigas *Atta.*<sup>120</sup> A partir de varias cepas cultivadas en agar papa glucosa de *E. weberi* halladas en nidos de *Atta colombica*, *Acromyrmex echinatior* y Trachymyrmex cornetzi de Colombia y Panamá, se identificaron 20, el 22,23-dehidroshearinina A (25) y las dicetopiperazinas azufradas melinacidina IV (27), melinacidina III (28), chetracina B (29) y chetracina C (30). También se informó que 25 y 27 inhiben el crecimiento de Pseudonocardia achinatiory P. octospinosus.<sup>124</sup>

Como se describe a continuación, los hongos simbiontes de algunas hormigas fungicultoras también se han sometido a estudios químicos (**Figura 10**). A partir de un hormiguero de *Apterostigma dentigerum* en Costa Rica se obtuvo el hongo *Bionectria* sp., de cuyo cultivo en agar papa dextrosa (PD) se aisló el policétido glicosilado bionectriol A (**31**); el cual no resultó antifúngico en ensayos de cocultivo con *Escovopsis* sp. y *Cyida albicans.*<sup>127</sup> La lepioclorina (**32**) proviene de un hongo presuntamente identificado como *Lepiota* sp. que se aisló de un nido de *Cyphomyrmex costatus*; el hongo se cultivó en un medio compuesto de sales minerales,

sacarosa y suplementado con vitaminas.<sup>128,129</sup> Del hongo *Tyridiomyces formicatum* del hormiguero de *Cyphomyrmex minutus*, cultivado en caldo PD suplementado con triptona, se aislaron una variedad de dicetopiperacinas (**33**, **34** y **35**). Estos compuestos inhibieron de forma no significativa el crecimiento de *Candida* sp.<sup>130</sup>



Figura 10. Moléculas aisladas de hongos encontrados en el jardín fúngico de hormigueros

Algunos estudios de bioprospección han llevado al aislamiento de metabolitos bioactivos de hongos asociados con hormigueros, asimismo, también ha sido atractiva la composición de sus entomopatógenos (**Figura 11**). De una muestra del montículo de un nido en Nigeria se aisló el hongo *Fusarium compactum* y de su cultivo axénico en un medio de tomate y avena se aislaron los triterpenos sulfatados A-108835 (**36**) y A-108336 (**37**), el primero es un diastereoisómero de otro compuesto descrito originalmente del fitopatógeno *Fusarium graminearum*. Los compuestos no inhibieron el crecimiento *in vitro* de bacterias y hongos patógenos para el humano, pero **37** inhibió la actividad proteolítica de la proteasa 3 del rinovirus, un blanco molecular para el tratamiento del resfriado común.<sup>131</sup> Del hongo entomopatógeno *Aspergillus nomius* aislado de hormigas *Atta sexdens rubropilosa* infectadas, se asilaron de su cultivo en agar PD las aflatoxinas B1 (**38**) y G1 (**39**). A partir de un hormiguero en la huasteca Hidalguense en México, se obtuvo el hongo *Talaromyces* sp., de cuyo cultivo en cereales se aislaron cuatro fenalenonas diméricas (**40-43**) inhibidoras de la proteína PTP1B<sub>1-400</sub> de cadena completa, diana terapéutica de la diabetes *mellitus* tipo 2.<sup>132</sup>



Figura 11. Moléculas aisladas de hongos asociados con hormigas y sus nidos

# JUSTIFICACIÓN

Desde que las bacterias resistentes a la penicilina comenzaron a ser un problema de salud en la década de los 50s, esta adaptación evolutiva de los patógenos se ha observado hacia casi todos los antibióticos desarrollados. Hoy en día, la RAM es una de las mayores amenazas a la salud pública, como lo reconocen algunas de las organizaciones de salud, economía y política más importantes: la OMS, el Fondo Monetario Internacional, el Banco Mundial y el G8.<sup>12,133</sup> En 2019 se estimó que las infecciones por bacterias resistentes provocaron anualmente 1.3 millones de muertes y contribuyeron a otras 3.7 millones, aunque de no tomarse acciones correctivas su impacto incrementará gradualmente hasta los 10 millones de defunciones en el año en 2050.<sup>25,26</sup> Algunas de las bacterias más preocupantes en el ámbito intrahospitalario se han agrupado y denominado ESKAPE, sin embargo, la OMS mantiene una lista más amplia.<sup>29,134</sup> Debido al riesgo que las bacterias resistentes a los fármacos convencionales representan para la humanidad tanto por su efecto sobre la salud humana, animal y del medio ambiente, se han propuesto una serie de acciones entre cuyos objetivos se reconoce la necesidad de nuevos tratamientos eficaces y seguros.<sup>13</sup> En este sentido, los metabolitos secundarios o especializados son una fuente conocida de prototipos estructurales para fármacos, destacándose por su gran diversidad y complejidad químico estructural, así como por su capacidad para interactuar con dianas moleculares.<sup>4,52,59</sup> Aunque pueden aislarse de una variedad de fuentes, los hongos destacan por poseer un amplio espacio químico por explorar debido a su amplia diversidad y el bajo número de especies que se han investigado.<sup>2,63</sup>Un ejemplo es la micobiota asociada a los insectos como las hormigas, cuya bacteriobiota en contraste se ha tratado más a fondo.<sup>9,119,121</sup> Los metabolitos fúngicos tienen bases estructurales únicas asociadas con unas variedad de actividades biológicas como la antibacteriana, la antifúngica, la anticancerígena, entre otras.<sup>3,62</sup> Es por los motivos planteados que esta investigación se basa en la bioprospección de micromicetos y compuestos antibacterianos a partir de la micobiota de los hormigueros en el suelo, a fin de asistir en la búsqueda de tratamientos para infecciones provocadas por bacterias multirresistentes de atención prioritaria para la OMS.

## **HIPOTESIS**

Los hongos microscópicos aislables de hormigas y sus nidos en el suelo son una fuente de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra patógenos humanos multirresistentes.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general es contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios de origen fúngico, provenientes de morfotipos aislados de hormigas y hormigueros en el suelo del bosque de niebla, que presenten actividad antibacteriana contra al menos un patógeno Gram negativo resistente a fármacos. Para lo que se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Obtener una colección de morfotipos de hongos microscópicos a partir de las hormigas y sus nidos presentes en el suelo del bosque de niebla de Veracruz, México, y sus áreas modificadas.
- Obtener una colección de extractos a partir de la maceración con disolventes orgánicos de cultivos a pequeña escala de los morfotipos.
- Evaluar por un método *in vitro* la capacidad de los extractos para inhibir el crecimiento y la formación de biopelícula de las bacterias multirresistentes *A. baumannii K. pneumoniae*.
- Estudiar la diversidad química de la colección de extractos mediante metabolómica no dirigida basada en el análisis de datos espectrométricos de alta resolución por redes moleculares, redes de bioactividad e identificaciones presuntivas.
- Seleccionar los morfotipos promisorios para el aislamiento de compuestos bioactivos mediante la integración de la información químico-biológica.
- Aislar los constituyentes químicos mayoritarios de los morfotipos priorizados mediante técnicas cromatográficas.
- o Caracterizar químicamente los compuestos aislados y determinar su actividad biológica.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### Equipos

Los análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) mediante análisis directo en tiempo real (DART) se adquirieron en modo positivo en un equipo JEOL AccuTOFTM JMS-T100LC (Akishima, Japón) con analizador de tiempo de vuelo (TOF), para lo cual las muestras se disolvieron en metanol (MeOH). Para otros análisis de HRMS, incluidos los metabolómicos, se empleó un sistema de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (CLAR) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) con analizadores de ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo y cuadrupolo-TOF (QTOF), así como un detector de absorción de luz ultravioleta (UV) y visible (vis) de arreglo de fotodiodos (PDA), modelo G6530BA de Agilent (Santa Clara, California, EUA).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensional y bidimensional se adquirieron a temperatura ambiente en equipos Bruker Avance III 400 MHz o Bruker Avance 700 MHz (Billerica, Massachusetts, EUA). La rotación óptica de las muestras se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343 (Waltham, Massachusetts, EUA); la unidad de concentración para las mediciones fue gramos por 100 mL. Los puntos de fusión sin corregir se determinaron en un equipo Fisher-Johns (EUA).

Las separaciones por cromatografía rápida (o *flash*) se realizaron en un equipo BÜCHI (Flawil, Suecia) modelo Pure C-810 con un detector UV-vis PDA. Los análisis cromatográficos de tipo analítico y los fraccionamientos por cromatografía líquida a nivel preparativo y semipreparativo se llevaron a cabo en un equipo de CLAR Waters™ (Milford, Massachusetts, EUA), con una bomba de gradiente cuaternario modelo 2535, un automuestreador, un detector UV-vis PDA modelo 2998 y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELS) modelo 2424. El control del equipo se realizó con la interfaz Empower 3.0.

Rutinariamente, se empleó una centrífuga C1108-C MyFUGE<sup>™</sup> Mini de Bechmark Scientific (Sayreville, Nueva Jersey, EUA), un agitador New Brunswick Scientific Excella E24 de Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), un baño ultrasónico Cole-Parmer modelo 8893 (Vernon Hills, Illinois, EUA), una incubadora INCU-SHAKER<sup>™</sup> Mini de Bechmark Scientific, un espectrofotómetro UV BioPhotometer plus modelo 6132 de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), un microscopio óptico VELAB modelo VE-T50 (Texas, EUA), un lector de microplacas BioTek Cytation

5 de Agilent, ELx808 BioTek de Agilent o MULTISKAN SkyHigh de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

## **Disolventes y reactivos**

A no ser que se indique de otra forma los disolventes y reactivos igualaron o excedieron las especificaciones de pureza de la ACS (Sociedad Química Estadounidense; ≥ 95-99%).<sup>135</sup> Para las separaciones cromatográficas y los análisis polarimétricos se usaron disolventes grado CLAR: acetonitrilo (MeCN) marca Supelco® (Bellefonte, Pensilvania, EUA), MeOH de Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, EUA), 1,4-dioxano y ácido fórmico de Fermont (Monterrey, Nuevo León, México). MeCN y MeOH grado espectrometría de masas marca Honeywell (Charlotte, Carolina del Norte, EUA) se emplearon en los análisis correspondientes. El agua empleada fue tipo 1 ASTM (Sociedad Americana de Pruebas y Materiales; ultrapura o mili-Q<sup>®</sup>). Los espectros RMN se registraron en disolventes deuterados de Sigma-Aldrich o Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, Massachusetts, EUA); los análisis se referenciaron respecto a su señal residual. De grado reactivo se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) de Fermont, sulfato de gentamicina C de GOLDBIO<sup>®</sup> (San Luis, Misuri, EUA) y sulfato de colistina, cristal violeta, cloruro de sodio, glicerol, sulfato de sodio anhidro, formaldehído al 37%, azul de lactofenol y celita de Sigma-Aldrich. Por otro lado, para extracciones se emplearon disolventes de grado industrial destilados, sin residuos según análisis por cromatografía en capa fina. El gel de sílice con tamaño de poro 60 Å y malla 230-400 se adquirió de grado técnico con Sigma-Aldrich. El agar y el caldo PD se adquirieron de MCD LAB (San Jacinto Amilpas, Oaxaca, México) y el caldo Mueller-Hinton (MH) de Condalab (Madrid, España); todos los medios de crecimiento se prepararon con agua destilada. El cereal para los cultivos sólidos fue Cheerios® miel de Nestlé® (Vevey, Suiza).

## Recolección de hormigas y tierra

Los nidos de hormigas fueron buscados en una reserva y ciertas áreas perturbadas del bosque mesófilo de montaña ubicado en los municipios de Xalapa de Enríquez, Coatepec y Teocelo, en Veracruz, México (**Figura 12** y **Anexo 1**).<sup>94</sup>



En la esquina superior izquierda se indica a nivel nacional (**A**), estatal (**B**) y municipal (**C**) la localización de los puntos de recolección. A la derecha, los marcadores de posición están numerados por orden de hallazgo y agrupados según su ubicación en el rancho El Águila (**a**), la finca Los Magueyes (**b**), la reserva natural "Santuario del Bosque de Niebla" (**c**), la localidad "La Orduña" (**d**, **e**), la finca "El Trianon" (**f**) y el parque ecológico "El Haya" (**g**); una imagen representativa de la vegetación se encuentra en la parte inferior de la figura. Además, el color de los marcadores varía con la vegetación en potrero (naranja), cafetal sombreado (verde), bosque de niebla (morado), camino agrícola (café; área rural) y parque ecológico (azul; área suburbana). Imágenes aéreas procedentes de Esri.<sup>136</sup>



Debido a los alcances de la investigación no se planteó un muestreo representativo de la mirmecofauna en cada sitio. Las hormigas y sus nidos se recolectaron a nivel del suelo a lo largo de los caminos de los puntos visitados. De cada hormiguero activo se recolectaron dos muestras de 40 mL de tierra, una de la zona próxima a su entrada, montículo o área de tránsito y otra a 5 m de estos puntos, donde la actividad de las hormigas no se observó (Figura 13); en todos los casos sin considerar la hojarasca y desde la superficie hasta los 10 cm de profundidad. También se muestreó el interior de dos nidos, en cuyo caso se recolectó la tierra de las paredes de un túnel que se halló al excavar horizontalmente desde una zanja hecha al lado de un montículo. La tierra se conservó en recipientes herméticos, protegida de la luz y en refrigeración a 0-5 °C, durante el trabajo de campo y por máximo 14 días hasta ser cultivadas. Las palas y espátulas utilizadas se lavaron con agua y se enjuagaron con etanol absoluto antes de cada recolección.<sup>137,138</sup> Adicionalmente, de cada nido se recolectaron hormigas de indistinta casta y se conservaron en etanol para su identificación taxonómica.<sup>139</sup> Una segunda muestra de hormigas se conservaron vivas en un recipiente hermético, protegido de la luz y en refrigeración, por máximo 12 h hasta que se procesaron. El exoesqueleto de estos insectos se esterilizó a través de la inmersión de cada muestra en etanol por 120-150 s, seguido de un enjuagué con agua destilada estéril y su secado, en un área de asepsia generada con una lámpara de alcohol. Los especímenes secos se refrigeraron.<sup>140,141</sup> Los insectos se trataron según las técnicas de captura y conservación descritas en la bibliografía.<sup>139</sup>



Figura 13. Puntos de recolección de tierra

#### Identificación de las hormigas

Las hormigas fueron identificadas a nivel de especie según claves morfológicas por el Dr. Jorge Ernesto Valenzuela Gonzáles adscrito al área de Ecología Funcional del Instituto de Ecología, A.C. (INECOL).<sup>142</sup> Los especímenes fueron montados con el apoyo de la Bióloga Dora Luz Martínez Tlapa y se depositaron en la Colección Entomológica IEXA del INECOL en Xalapa, Veracruz, México, con ayuda de su curadora Dra. Viridiana Vega Badillo, bajo el identificador IEXA-2024-IM12.

#### Aislamiento de morfotipos fúngicos

Este apartado se enfocó en obtener la mayor diversidad de morfotipos cultivables mediante aislamientos microbiológicos (Figura 14). En el caso de la tierra se aplicó una técnica de dilución, limitada al aislamiento de la población fúngica capaz de crecer en medio agar PD. En orden aleatorio, a partir cada muestra se preparó una suspensión 1:10 peso/volumen en agua destilada estéril que se diluyó de manera seriada 1:10 en cuatro ocasiones. A continuación, 350 µL de las 3 suspensiones menos concentradas se sembraron por duplicado en cajas Petri de 10 cm de diámetro con agar PD suplementado con gentamicina a una concentración de 150 µg/mL. Los cultivos se incubaron por varias semanas a temperatura ambiente bajo ciclos normales de luz-oscuridad y de las colonias que se desarrollaron se obtuvieron morfotipos axénicos mediante resiembras consecutivas.<sup>137,138</sup> Por otro lado, para el aislamiento de los hongos del interior de las hormigas o endógenos, en orden aleatorio entre 9 y 90 hormigas de cada nido se trituraron en la cantidad suficiente de agua destilada estéril que las cubrió (350 o 500 µL) y se continuó con la siembra directa de la suspensión en agar PD suplementado con gentamicina, bajo las condiciones y los pasos subsecuentes que se indicaron previamente para las muestras de tierra.<sup>140</sup> En este trabajo, las colonias axénicas se denominaron morfotipos, que se diferenciaron por características macroscópicas como el tamaño, elevación, borde, color (anverso y reverso), tipo de micelio, presencia de exudados y forma de sus colonias; la colección se clasificó en dos grandes grupos según su aspecto filamentoso o mucoide.<sup>143</sup> A todos los morfotipos se les asignó al azar una clave alfanumérica compuesta por "IQ-" seguida de un numeral desde 751 a 1539 y de 1544 a 1546, también fueron fotografiados y se les resguardó en agar PD conservado a temperatura ambiente (Anexo 2).



Figura 14. Ejemplos selectos de morfotipos aislados

## Identificación de los morfotipos fúngicos

La determinación a nivel de genero se basó en el alineamiento de la región espaciadora transcrita interna 2 (ITS; **Anexo 3**) con las secuencias en el repositorio del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se empleó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) optimizada para secuencias altamente similares (megablast) a fin de hallar materiales de referencia "tipo" con más del 97% de coincidencia y 80% de cobertura.<sup>144</sup> La extracción de ADN ribosómico, su amplificación y secuenciación se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez adscrito al Departamento de El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), según el método descrito por Martínez-Aldino y colaboradores (2023).<sup>67</sup> Además, algunos morfotipos fueron clasificados a nivel de división según sus características morfológicas observadas en tinciones con azul de lactofenol (**Anexo 4**).<sup>145</sup>

#### Cultivo y extracción a escala pequeña

Para el caso de los hongos filamentosos (248), primeramente, de cada morfotipo elegido al azar se preparó un cultivo líquido en 5 mL de caldo PD en tubos de plástico cerrados herméticamente, que se inoculó con un trozo de 1 cm<sup>2</sup> de agar con micelio y se incubó por ~11 días en agitación orbital a 100 rpm, con periodos normales de luz-oscuridad y a temperatura ambiente. Con el cultivo líquido se inocularon 3 g de cereal Cheerios® contenido en tubos de plástico o matraces Erlenmeyer de 25 mL de vidrio, cerrados un tapón de papel y tela, que se incubaron por ~25 días en reposo bajo las condiciones ya mencionadas. Cuando el micelio cubrió en su totalidad el cereal se extrajo mediante maceración con agitación a 100 rpm por 24 h con una mezcla 50:25:25 de acetato de etilo-metanol-diclorometano (AcOEt-MeOH-DCM). El disolvente de extracción se filtró por algodón desengrasado, se llevó a sequedad y se calculó su rendimiento (Anexo 2). 132,146 Por otro lado, el extracto de los hongos de consistencia mucoide (4) se obtuvo en orden aleatorio a partir de un número variable de cultivos líguidos. Cada cultivó consistió en 70 mL de caldo PD en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que se inoculó con un trozo de agar con colonias, incubado por ~30 días en agitación y bajo las condiciones referidas. Para obtener el extracto los cultivos líquidos se sometieron a 3 ciclos consistentes en su congelamiento a –23 °C y sonicación por 31 min. Los cultivos lisados se extrajeron mediante partición líquido-líquido con un volumen equivalente de DCM en cuatro ocasiones. El disolvente de extracción se filtró por sulfato de sodio anhidro, se concentró y se calculó su rendimiento. Adicionalmente, se incubaron y se extrajeron controles del medio de crecimiento en su versión para morfotipos filamentosos y mucoides, de forma intercalada y regular a los cultivos fúngicos.

## Cultivo y extracción a escala media

Para el estudio químico, el proceso de cultivo se escaló a tamaño medio. En el caso de los hongos filamentosos se realizó en concordancia con lo descrito para la versión pequeña, pero ajustándose lo necesario a un número variable de cultivos con 9 g de Cheerios® en matraces Erlenmeyer de 250 mL (**Cuadro 1**). El proceso de extracción se realizó con ajustes en el volumen del disolvente, pero también según el método que se mencionó. Asimismo, un control del medio de crecimiento también fue considerado.

Morfotipo	Número de cultivos	Días de incubación del caldo	Días de incubación en cereal	Extracto obtenido (g)
IQ-807	26	13	21	1.8
IQ-814	11	13	21	5.2
IQ-819	16	13	21	4.0
IQ-1038	13	13	21	3.9
IQ-1129	4	13	21	1.7
Medio de crecimiento*	2	13	21	1.0

Cuadro 1. Condiciones de cultivo a escala media

\* Cultivos control.

#### Análisis metabolómico no dirigido

## Análisis por espectrometría de masas en tándem

Las adquisiciones se realizaron con un equipo CLAR-HRMS-ESI-PDA-QTOF en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) en el Instituto de Química (IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con el apoyo del M. en C. Everardo Tapia Mendoza. En orden aleatorio, los extractos se disolvieron en DMSO a una concentración de 2 mg/mL y mediante centrifugación a 6000 rpm durante 1 min, se retiró cualquier sedimento para analizar sin réplicas el sobrenadante. Las separaciones cromatográficas se realizaron con una columna de sílice modificada C18 Gemini® NX-C18 (2 × 75 mm, 3 µm de tamaño de partícula) de Phenomenex® (Torrance, California, EUA) a 30 °C. La fase móvil consistió en la mezcla de MeCN y agua ácida (al 0.1% con ácido fórmico) a un flujo de 0.4 mL/min, empleándose un gradiente que inició con el aumento lineal de 15% a 100% de MeCN en 8 min y que se mantuvo en 100% de MeCN por 1.5 min antes de regresar a las condiciones iniciales. La fuente de ionización por electronebulización funcionó en modo positivo. Como gas auxiliar y envolvente se utilizó nitrógeno a 275 °C y 300 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue 4.5 kV y el de la boquilla 1 kV. Los espectros se adquirieron con el analizador en modo de barrido completo en un intervalo m/z 100 a 2500 y para el análisis en tándem se seleccionaron los 2 iones precursores más abundantes por ciclo, que fueron fragmentados mediante disociación activada por colisión a una energía normalizada de 30 eV. El detector UV-vis PDA registro las absorbancias a 220, 254 y 320 nm.147-149

#### Análisis por redes moleculares e identificaciones promisorias

Mediante la Red Molecular Global Social de Productos Naturales (GNPS) se realizaron los análisis por redes moleculares, estos se basan en la similitud de los patrones de fragmentación de los iones precursores a lo largo de los cromatogramas de iones totales (TIC) de la colección de extractos. Una red molecular se compone de nodos unidos por aristas, cada nodo representa un hipotético compuesto caracterizado por un patrón de fragmentación consenso y se une por aristas con otros cuyos patrones superan un umbral de similitud. Asimismo, dicha plataforma facilita la identificación presuntiva de los nodos mediante el comparativo de sus patrones de fragmentación consenso contra una librería.<sup>147,150</sup> Los espectros de masas en tándem se procesaron con el programa MSConvert de ProteoWizard para anotar los picos mediante al algoritmo Vendor y transformar los archivos a la extensión pública mzML.<sup>151</sup> Los espectros de los 252 morfotipos se cargaron en el servidor de GNPS y se construyeron 2 redes moleculares clásicas, una para los 248 hongos filamentosos y otra para los 4 mucoides, con los parámetros básicos de 0.02 Da como tolerancia de la masa del ion precursor y de los iones fragmento, 0.7 como puntuación mínima del coseno, un mínimo de 6 iones fragmento para conectar dos espectros consenso, 1999 Da como la diferencia máxima del ion precursor entre dos nodos vecinos, un máximo de 10 conexiones por nodo, 2 como tamaño mínimo de agrupación, el agrupamiento en espectros consenso activo, 100 como el número máximo de nodos en una red y restándose las señales de 5 muestras de DMSO y de los extractos del medio crecimiento, doce obtenidos de medio sólido para el análisis de los hongos filamentosos y un cultivo líquido para el caso de los hongos mucoides. Las redes se editaron con el programa Cytoscape 3.10.3.<sup>152</sup>

La búsqueda de los espectros consenso en las librerías se realizó a un nivel 2 de confianza según la Iniciativa de Estándares de Metabolómica (*Metabolomics Standards Initiative*).<sup>153</sup> Se basó en la coincidencia de la masa exacta del ion precursor con une error menor a 5.1 ppm, una diferencia de masa menor a 0.0033 Da, que 5 o más fragmentos fueran compartidos y el coseno de similitud de los espectros superar un valor de 0.7. Además, las librerías se limitaron a los registros de análisis por ionización ESI+ y denominados clase 1 u "oro", es decir, aquellos cuya información espectrométrica proviene de compuestos aislados y ha sido revisada por pares para ser integrada a GNPS. Las identificaciones fueron verificadas manualmente para cada morfotipo de acuerdo con el TIC correspondiente, corroborándose que el error y la diferencia de masa respetaran los

límites establecidos (**Anexo 5**). El proceso de realizar identificaciones presuntivas con la finalidad de evitar su aislamiento se conoce como desreplicar.<sup>154</sup>

#### Mapeo de la actividad de compuestos

Mediante la plataforma en línea NP Analyst los datos espectrométricos y de bioactividad fueron correlacionados a través de puntuaciones basadas en coeficientes de correlación de Pearson y medias aritméticas, a fin de identificar promisoriamente las relaciones *m*/*z* responsables del efecto.<sup>155</sup> En este análisis se consideraron los valores normalizados entre 0 y 1 de cada réplica, por tipo de determinación y patógeno. Los datos espectrométricos consistieron en la red molecular clásica generada por GPNS. Para construir una red se fijó la puntuación de actividad y agrupamiento en 0.25 y 0.1, respectivamente. La red se editó y visualizó en Cytoscape 3.10.3, así como en un formato de diagrama de dispersión en el portal de NP Analyst.

## Determinación de la actividad antibacteriana

#### Patógenos

Las bacterias de trabajo fueron *A. baumannii* cepa A564 y *K. pneumoniae* serotipo K2, la primera es una bacteria multirresistente sensible a colistina y la segunda se trata de una cepa hipervirulenta multirresistente.<sup>42,156</sup> Estas especies Gram negativas son de origen intrahospitalario y fueron donadas por el Dr. Rodolfo García Contreras adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las bacterias se conservaron criogénicamente a -80 °C en una mezcla 4:1 de caldo Mueller Hinton (MH) y glicerol.

#### Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano

Se basó en las directrices del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para ensayos de microdilución en caldo.<sup>157</sup> Se partió de cultivos de las bacterias en caldo MH incubados por 16-24 h en agitación a 37 °C. Del cultivo líquido se preparó una suspensión ajustada a 0.5 en la escala de McFarland (equivalente a 1.5 × 10<sup>8</sup> UFC/mL de *E. coll*) cuya densidad óptima medida a 600 nm en una celda de plástico de 1 cm de paso óptico fue 0.08-0.13 unidades de absorbancia (UA). Sin embargo, los ensayos requirieron una dilución 1:20 en caldo MH que se consideró viable por hasta 15 min una vez preparada. Se emplearon microplacas de 96 pozos, de 300 µL de volumen por pozo y de fondo plano, en experimentos por triplicado en cada una se distribuyeron 29 muestras, el control positivo, de crecimiento y de esterilidad. A no ser que ese indique algo más el vehículo fue DMSO. El control positivo fue sulfato de gentamicina C o sulfato

de colistina. Para evaluar las muestras y el control positivo en cada pozo se depositaron 2 µL de ésta, 88 µL de caldo MH y 10 µL de suspensión bacteriana diluida, para evaluar el control de crecimiento la alícuota de la muestra consistió en vehículo y en el caso del control de esterilidad también se sustituyó la suspensión bacteriana por caldo MH. La densidad óptica de los tratamientos se midió en un lector de microplacas a 600 nm al inicio del periodo de incubación y tras 16-24 h de crecimiento a 37 °C, siempre con previa agitación lineal por 5-10 segundos. Todas las absorbancias fueron corregidas mediante la resta de la lectura inicial a la final, entonces el porcentaje de inhibición se calculó para cada pozo respecto al promedio del control de crecimiento con la **Ecuación 1**. El resultado de cada tratamiento se reportó como el promedio y la desviación estándar de las réplicas. Los valores negativos se consideraron un 0% de inhibición y el valor máximo a reportar fue 100%.

Inhibición del crecimiento bacteriano en % = 
$$\left(1 - \frac{Absorbancia_{muestra}}{Absorbancia_{control de crecimiento}}\right)$$
(100) Ecuación 1

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como aquella más pequeña que generó 100% de inhibición cuando se evaluó una serie de concentraciones seriadas a 200, 100, 50, 10, 1 y 0.1 µg/mL, sin embargo, también se calculó una CMI estimada a partir de la aplicación de una función modificada de Gompertz sobre la curva concentración-respuesta.<sup>158</sup> Además, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) a partir de un método que siguió las directrices de la Sociedad Americana de Microbiología.<sup>159</sup> Para lo cual, una vez realizada la curva concentración-respuesta se estimó el número de UFC/mL a las concentraciones con un 100% de inhibición del crecimiento. Una dilución adecuada del contenido de los pozos de cada concentración se sembró por estriado en cajas Petri de 10 cm de diámetro con agar MH, por triplicado y se incubaron en oscuridad por 24 h a 37 °C de temperatura. La CMB fue aquella donde el número estimado de UFC/mL no excedió el 0.1% de las contadas al inicio del experimento en los pozos del control de crecimiento.

#### Determinación del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula

Los compuestos que no inhibieron el crecimiento de *A. baumannii* cepa A564 en más del 10% fueron candidatos idóneos para la búsqueda de inhibidores de la formación de biopelícula. Esta determinación se basó en la cuantificación espectrofotométrica de la biopelícula a través de su tinción con una disolución de cristal violeta. El colorante se preparó mediante la disolución de 750 mg de cristal violeta y 250 mg de cloruro de sodio en una mezcla conformada por 4.8 mL de

formaldehído y 100 mL de una disolución de etanol al 50% en agua destilada. En resumen, tras finalizar el ensayo de inhibición del crecimiento el contenido de la microplaca se retiró minuciosamente mediante su inmersión 3 veces en agua corriente, se dejó secar y a continuación cada pozo se tiñó con 125 µL del colorante, a temperatura ambiente y por mínimo 15 min. El exceso de colorante se descartó por enjuagues con agua corriente en 3 ocasiones y se dejó secar. En seguida, el cristal violeta de la biopelícula de cada pozo se solubilizó en 125 µL de ácido acético al 30% en agua destilada y después de un periodo de espera de 15 min a temperatura ambiente, se determinó la absorción de luz UV a 570 nm en un lector de microplacas, previa agitación lineal por 5-10 segundos. El porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula se calculó para cada pozo respecto al promedio del control de crecimiento con la **Ecuación 2**. El resultado de cada tratamiento se reportó como el promedio de las réplicas acompañado de su desviación estándar. Los valores negativos se consideraron un 0% de inhibición y el valor máximo a reportar fue 100%.

Inhibición de la formación de biopelícula en % =  $\left(1 - \frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control de crecimiento}}}\right)$  (100) Ecuación 2

## Estudio químico

#### Perfilamiento de la composición química

A fin de conocer la composición de los extractos y las fracciones de interés, así como purificar sus constituyentes, se partió de un método general de análisis por CLAR (**Figura 15**); el gradiente de elusión se optimizó a partir de este, a fin de lograr señales cromatográficas resueltas de acuerdo con los máximos de absorción de luz UV y las señales del detector ELS. Como fase estacionaria se empleó una columna de sílice modificada C<sub>18</sub> Phenomenex® Gemini NX-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) o Waters<sup>™</sup> Symmetry® (250 × 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil eluyó a un flujo de 1 mL/min y el método de análisis consistió en un gradiente de MeCN o MeOH (A) y agua mili-Q al 0.1% con ácido fórmico (B); el gradiente inicio con el aumento lineal de 20 a 100% de A en 30 min y se mantuvo constante por 4.5 min antes de regresar a las condiciones iniciales. El detector UV-vis PDA adquirió en modo de barrido desde 200 a 800 nm, mientras que el detector ELS funcionó con una ganancia de 300, la presión de gas nitrógeno fue 25 psi, el tubo de secado se calentó a 50 °C y el nebulizador al 59% se calentó a 35.4 °C. Las muestras se disolvieron en DMSO o una mezcla dioxano-MeOH 1:1 a una concentración de 15 mg/mL y analizó el sobrenadante tras su centrifugación por al menos 1 min.



Las fracciones de mediana polaridad consistieron en la fase MeCN-MeOH 1:1 del fraccionamiento primario. Se reporta la absorción de luz UV (A1 a A5) y la señal del detector ELS (B1 a B5), los cromatogramas en color azul corresponden a los morfotipos y los cromatogramas en verde al medio de crecimiento. Muestras analizadas por el método general basado en un gradiente de agua y MeCN.

Figura 15. Cromatogramas de las fracciones de mediana polaridad de algunos morfotipos

#### Aislamiento de compuestos y determinación químico estructural

El fraccionamiento primario de los extractos escalados se realizó por extracciones líquido-líquido. En un inicio cada extracto se disolvió y se extrajo en el volumen mínimo necesario (120-300 mL) de una mezcla 1:1 de DCM y agua-MeOH (8:2). A continuación, la fase en agua-MeOH se extrajo en al menos cuatro ocasiones adicionales con un volumen equivalente de DCM. Las fases se filtraron por algodón desgrasado, la fase de DCM se secó con sulfato de sodio anhidro; ambas fases se llevaron a sequedad mediante destilación a presión reducida y se determinó su rendimiento. En la siguiente etapa la fase de DCM se disolvió en el volumen mínimo necesario (< 40 mL) de MeCN-MeOH (1:1) y se sometió a un proceso de desgrase mediante extracción con un volumen similar de hexano en al menos 5 ocasiones. Ambas fases también se filtraron, se secaron y se determinó su rendimiento. Para fines comparativos los extractos del medio de crecimiento sólido y líquido también fueron fraccionados de manera similar (**Anexo 6**).

El fraccionamiento secundario de los extractos se efectuó por cromatografía rápida en fase reversa empleando como fase estacionaria gel de sílice modificada C<sub>18</sub> Biotage® HP-Sphere™ (Uppsala, Suecia) con tamaño de partícula de 25 µm, en cartuchos y columnas de tamaño variable. Las muestras se aplicaron preadsorbidas en una mezcla de celita® 545 y gel de sílice de 60 Å de tamaño de poro (2:4) o en disolución. El detector UV-vis PDA adquirió a 254, 360, 450, 580 nm y en modo de barrido desde 200 a 800 nm. Como fase móvil se utilizaron mezclas de agua-ácido fórmico al 0.1 % y MeOH o MeCN en diferentes gradientes según el caso, a un flujo de 10-25 mL/min. Los lavados de la columna se realizaron con MeOH o mezcla de MeOH-DCM (8:2). Se recolectaron automáticamente eluatos de volumen variable (≤ 50 mL) de acuerdo con los cambios del máximo de absorción, los cuales se agruparon en diferentes fracciones de acuerdo con el análisis del cromatograma.

El fraccionamiento primario de los extractos escalados se realizó por extracciones líquido-líquido. En un inicio cada extracto se disolvió en el volumen mínimo necesario (120-300 mL) de una mezcla 1:1 de DCM y 8:2 agua-MeOH. A continuación, la fase en agua-MeOH se extrajo mínimo cuatro ocasiones adicionales con un volumen equivalente de DCM. Las fases se filtraron por algodón desgrasado, la de DCM además por sulfato de sodio anhidro; todas se llevaron a sequedad mediante destilación a presión reducida y se determinó su rendimiento. En la siguiente etapa la fase de DCM se disolvió en el volumen mínimo necesario (< 40 mL) de MeCN-MeOH 1:1 y se sometió a un proceso de desgrase con un volumen similar de hexano al menos en 5

ocasiones. Estas fases también se filtraron, se secaron y se determinó su rendimiento. Para fines comparativos el extracto del control del medio de crecimiento sólido también fue fraccionado

Para el fraccionamiento secundario por cromatografía rápida se empleó como fase estacionaria gel de sílice modificada C<sub>18</sub> Biotage® HP-Sphere™ (Uppsala, Suecia) con un tamaño de partícula de 25 µm, empacadas en cartuchos y columnas de tamaño variable. Las muestras se aplicaron absorbidas en una mezcla 2:4 de celita® 545 y gel de sílice de 60 Å de tamaño de poro o en disolución. El detector UV-vis PDA del equipo adquirió a 254, 360, 450, 580 nm y en modo de barrido desde 200 a 800 nm. La fase móvil eluyó a un flujo de 10-25 mL/min en una variedad de gradientes en fase reversa, todos consistentes en una mezcla de agua al 0.1% con ácido fórmico con MeOH o MeCN y lavados de la columna con MeOH o una mezcla 8:2 de MeOH-DCM. Los eluatos se recolectaron automáticamente a volumen variable (≤ 50 mL) según los cambios en el máximo de absorción de la fase móvil, pero un análisis consecuente del cromatograma condujo a su agrupación en las fracciones finales.

Los constituyentes mayoritarios de algunas fracciones se aislaron y purificaron por cromatografía de líquidos preparativa y semipreparativa en un equipo de CLAR. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice modificada  $C_{18}$  empacada en una columna Phenomenex® Gemini NX- $C_{18}$  (5 µm de tamaño de partícula) con un tamaño de 7.8 × 100 mm y 250 × 21.6 mm. Como fase móvil se emplearon diversos gradientes a un flujo de 4 y 13-15 mL/min compuesto por la mezcla de agua al 0.1% con ácido fórmico y MeOH o MeCN (**Anexo 7**). Las muestras se disolvieron en el volumen mínimo necesario de dioxano-MeOH 1:1 (30-120 mg/mL), pero por fraccionamiento se inyectaron manualmente hasta 500 µL del sobrenadante, una vez que la disolución fue centrifugada por más de 1 min. El detector UV-vis PDA registro la absorción de luz a 254 nm y en modo de barrido desde 200 a 800 nm. Los eluatos se colectaron a volumen variable según los cambios en el máximo de absorción de la fase móvil, pero un análisis cuidadoso del cromatograma condujo a las fracciones finales. La estructura química de los compuestos aislados se determinó a partir del análisis de su información de rotación óptica, espectroscópica y espetrométrica, en conjunto con la consulta de las bases de datos SciFinder®, Reaxys® y el Dictionary of Natural Products.

## Compuestos aislados de la cepa IQ-1129

El extracto a escala media (1.7 g) se fraccionó mediante separación por partición líquido-líquido, obteniéndose las fases agua-MeOH 8:2 (624 mg), MeCN-MeOH 1:1 (425 mg) y hexano (455 mg). A continuación, la fase MeCN-MeOH se adsorbió en una mezcla de celita® (1.7 g) y gel de sílice (150 mg) para fraccionarse por cromatografía rápida en fase reversa. Se empleó un sistema de elusión a 20 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua acida 5:95→5:95 durante 8.5 min, 5:95→100:0 en 10 min y 100:0→100:0 durante 16.5 min, que finalizó con un lavado con MeCN-MeOH 5:95 durante 20 min. Se obtuvieron ocho fracciones secundarias. Posteriormente, la fracción secundaria F7 (48.1 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos preparativa a razón de dos elusiones; la muestra se inyectó disuelta en dioxano-MeOH 1:1 a una concentración de 120.3 mg/mL. A un flujo de 14 mL/min el gradiente que se aplicó fue de MeOH y agua ácida 70:30→85:15 en 23 min, que prosiguió con un lavado con MeOH. Los eluatos se agruparon en trece fracciones terciarias. La fracción terciaria F7.8 (13 mg) se identificó como PF1140 (44, Figura 16). La fracción terciaria F7.13 (16.8 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos semipreparativa. La muerta se inyectó a una concentración de 56 mg/mL en dioxano-MeOH y se eluyó con un sistema de MeCN y agua ácida 75:25→85:15 en 30 min, a un flujo de 4.6 mL/min, del que se obtuvieron siete fracciones. La fracción cuaternaria F7.12.2 (1.3 mg) se identificó como deoxi-PF1140 (45, Figura 16). El diagrama de fraccionamiento puede consultarse en el Anexo 8. Las constantes físicas, la información espectroscópica y espectrométrica de los compuestos son comparables a las de publicaciones previas.<sup>160,161</sup>



Figura 16. Compuestos aislados de IQ-1129

PF1140 (**44**): polvo ligeramente amarillo; punto de fusión 168-169 °C; HRMS-DART, *m*/*z*278.1749  $[M+H]^{+}$  (calculado para C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>, 278.1756,  $\Delta$  -2.5 ppm);  $[\alpha]^{25}_{D}$  -146.00 (*c* 0.15, MeOH); la información de RMN puede consultarse en el **Cuadro 2** y los espectros del **Anexo 13** al **Anexo 16**.

Deoxi-PF1140 (**45**): polvo ligeramente amarillo; punto de fusión 155-157 °C; HRMS-DART, *ml z* 262.1817 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub>, 262.1807,  $\Delta$  3.8 ppm); [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> -130.53 (*c* 0.19, MeOH); la información de RMN se encuentra en el **Cuadro 2** y los espectros del **Anexo 17** al **Anexo 20**.

	PF1140 ( <b>44</b> )				Deoxi-F	PF1140 (	<b>45</b> )	
Posición	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}$	δн	Multiplicidad	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}$	δн	Multiplicidad
1	С	160.2			С	160.0		
3	СН	129.5	7.48	d, J=7.6	CH	128.1	7.49	d, <i>J</i> = 7.6
4	СН	98.6	5.87	d, <i>J</i> =7.6	CH	98.2	5.87	d, <i>J</i> = 7.6
4a	С	159.2			С	158.6		
6	СН	74.6	4.63	c, /= 6.6	CH	74.5	4.64	c, <i>J=</i> 6.5
6a	С	33.9			С	33.9		
7	$CH_2$	44.6	1.71	m	CH <sub>2</sub>	44.6	1.73	m
			1.02	dd, <i>J</i> = 14.1,			1.04	t, <i>J =</i> 13.5
				12.7				
8	СН	27.0	1.54	m	CH	27.1	1.56	m
9	$CH_2$	44.3	1.66	m	CH <sub>2</sub>	44.4	1.69	m
			0.89	m			0.90	m
10	СН	37.9	1.60	m	CH	38.0	1.62	m
10a	СН	45.3	2.26	d, /= 10.8	CH	45.4	2.27	d, <i>J</i> = 10.9
10b	С	109.8			С	109.5		
11	CH₃	14.8	1.25	d, /= 6.6	CH₃	14.8	1.26	d, <i>J</i> = 6.6
12	CH₃	21.6	0.70	S	CH₃	21.7	0.71	S
13	CH₃	23.0	0.86	d, /= 6.4	CH₃	23.0	0.87	d, <i>J=</i> 6.5
14	CH₃	20.5	0.88	d, /= 6.6	CH <sub>3</sub>	20.6	0.94	d, <i>J</i> = 6.6

Cuadro 2. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 44 y 45

Análisis de RMN <sup>13</sup>C a 100 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz para **44** y RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz para **45**. Adquisiciones en CDCl<sub>3</sub>.

## Compuestos aislados de la cepa IQ-1038

El extracto de escala media (3.9 g) se fraccionó mediante separación por partición líquido-líquido, obteniéndose las fases agua-MeOH 8:2 (1.1 g), MeCN-MeOH 1:1 (1.5 g) y hexano (1.1 g). A continuación, la fase MeCN-MeOH se adsorbió en una mezcla de celita® (2.5 g) y gel de sílice (700 mg) para fraccionarse por cromatografía rápida en fase reversa. A un flujo de 20 mL/min se empleó como fase móvil un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 7 min, 5:95→100:0 en 12 min y 100:0→100:0 durante 17.8 min, que finalizó de un lavado con MeOH por 20 min. Se obtuvieron ocho fracciones secundarias. Posteriormente, la fracción secundaria F3 (185.3 mg) se separó por cromatografía líquida preparativa a razón de cuatro elusiones; la muestra se inyectó disuelta en dioxano-MeOH 1:1 a una concentración de 280.8 mg/mL. Se aplicó un gradiente a 15 mL/min de MeOH y agua ácida 30:70→57:43 en 20 min, que prosiguió con un lavado con MeOH.

Los eluatos se agruparon en siete fracciones terciarias. En la fracción terciaria F3.3 se formaron cristales espontáneamente (112.8 mg), que se decantaron y correspondieron a ácido penicílico (**18**, **Figura 17**) de acuerdo con la coincidencia de sus constantes físicas, datos espectrométricos y espectroscópicos disponibles.<sup>162,163</sup> El diagrama de separación puede consultarse en el **Anexo 9**.



Figura 17. Compuesto aislado de IQ-1038

Ácido penicílico (**46**): polvo blanco; punto de fusión 86-87 °C; HRMS-DART, *m*/*z* 323.1134 [2M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>, 323.1130, Δ 1.2 ppm); [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> -0.16 (*c* 0.25, MeOH); la información de RMN se halla en el **Cuadro 3** y los espectros del **Anexo 21** al **Anexo 23**.

Bogigión -	Ácido penicílico ( <b>46</b> )								
FUSICION -	Tipo de carbono	$\delta_{c}$	$\delta_{H}$	Multiplicidad					
2	С	171.6							
3	СН	89.4	5.12	S					
4	С	179.5							
5	С	103.2							
6	С	139.6							
7	CH <sub>2</sub>	116.5	5.18	S					
			5.46	S					
8	CH₃	60.1	3.91	S					
9	CH₃	17.5	1.75	S					

Cuadro 3. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 46

Análisis de RMN  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz y RMN  $\,^1\text{H}$  a 400 MHz. Adquisiciones en CDCl\_3.

## Compuestos aislados de la cepa IQ-1017

En el extracto a escala pequeña del morfotipo IQ-1017 (**Figura 18**) se obtuvo por cristalización espontánea, cristales transparentes que fueron separados por decantación y se lavaron con hexano. El material obtenido (58.9 mg) se identificó como brefeldina A (**Figura 19**) de acuerdo con la coincidencia de sus contantes físicas, su información espectrométrica y espectroscópica con reportes previos.<sup>164,165</sup>





Figura 18. Morfotipo IQ-1017

Figura 19. Compuesto aislado de IQ-1017

Brefeldina (**47**): cristales transparentes; punto de fusión 204-205 °C; HRMS-DART, *m*/*z* 281.1763  $[M+H]^+$  (calculado para C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>, 281.1752,  $\Delta$  3.9 ppm);  $[\alpha]^{25}_{D}$  +20.00 (*c* 0.17, MeOH); la información de RMN puede consultarse en el **Cuadro 4** y los espectros del **Anexo 24** al **Anexo 27**.

Docición -	Brefeldina A ( <b>47</b> )					
FUSICION -	Tipo de carbono	$\delta_{c}$	$\delta_{H}$	Multiplicidad		
1	СН	74.3	3.92	dt, <i>J</i> = 9.9, 2.6		
2	СН	154.4	7.34	dd, <i>J</i> = 15.5, 3.0		
3	СН	116.3	5.71	dd, <i>J</i> = 15.6, 2.0		
4	С	165.7				
6	CH	70.8	4.70	dcd, <i>J</i> = 12.7, 6.5, 1.7		
7	CH <sub>2</sub>	33.4	1.48	m		
			1.72	m		
8	CH <sub>2</sub>	26.4	0.75	m		
			1.79	dd, <i>J</i> = 6.6, 3.3		
9	CH <sub>2</sub>	31.4	1.92	tdd, <i>J</i> = 10.3, 4.8, 2.4		
			1.76	ddd, <i>J</i> = 4.3, 2.7, 1.3		
10	CH	129.2	5.66	ddd, <i>J</i> = 15.1, 10.3, 4.6		
11	CH	137.1	5.20	dd, <i>J</i> = 15.3, 9.7		
11a	CH	43.3	2.30	m		
12	CH <sub>2</sub>	43.0	1.97	ddd, <i>J</i> = 11.6, 8.7, 5.1		
			1.29	dddd, <i>J</i> = 13.1, 8.0, 5.4, 1.3		
13	CH	70.5	4.04	q, <i>J</i> = 5.4		
14	CH <sub>2</sub>	40.9	1.65	m		
			1.82	dddd, <i>J</i> = 13.1, 8.6, 4.7, 1.4		
14a	CH	51.7	1.70	dd, <i>J</i> = 9.7, 8.0		
15	CH₃	20.7	1.18	d, <i>J</i> = 6.2		

Cuadro 4. Información de RMN	<sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H de <b>47</b>
------------------------------	---

RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz para **45**. Adquisiciones en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ).

## Compuestos aislados de la cepa IQ-819

El extracto de escala media (4.0 g) se fraccionó mediante separación por partición líquido-líquido, obteniéndose las fases 8:2 agua-MeOH (613.7 mg), 1:1 MeCN-MeOH (1.6 g) y hexano (1.6 g). A continuación, la fase MeCN-MeOH se adsorbió en una mezcla de celita® (22.0 g) y gel de sílice (4.6 g) para fraccionarse por cromatografía rápida en fase reversa. Se empleó un sistema de elución a 10 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 10 min, seguido por ajustes hasta alcanzar 100% de MeCN en 23 min y un lavado con MeOH por 16.6 min; el gradiente se detalla en el **Anexo 7**. Se obtuvieron diez fracciones secundarias. Posteriormente, la fracción secundaria F3 (193.1 mg) se fraccionó mediante cromatografía de líquidos preparativa a razón de tres elusiones; la muestra se inyectó disuelta en dioxano-MeOH 1:1 a una concentración de 203.3 mg/mL. El gradiente que se aplicó a un flujo de 14 mL/min fue MeOH y agua ácida 45:55→90:10 en 25 min, que prosiguió con un lavado con MeOH. Los eluatos se agruparon en 16 fracciones terciarias (F3.1 a F3.16).

La fracción terciaria F3.3 (18.7 mg) se fraccionó por cromatografía de líquidos semipreparativa. Esta se inyectó a una concentración de 53.4 mg/mL en dioxano-MeOH y se eluyó con un sistema de MeCN y agua ácida 45:55→62:38 en 15 min a un flujo de 4.6 mL/min del que se obtuvieron cinco fracciones (F3.3.1-F3.3.5). La fracción cuaternaria F3.3.2 (2.7 mg) se identificó como la tricodermamida A (**48, Figura 20**).

La fracción terciaria F3.11 (94.5 mg) se identificó como el ácido tricodérmico A (**49**, **Figura 20**). La fracción terciaria F3.12 (10.7 mg) se fraccionó mediante cromatografía de líquidos semipreparativa. Esta se inyectó a una concentración de 42.8 mg/mL en dioxano-MeOH y se eluyó con un sistema de MeCN y agua ácida 60:40→87:13 en 20 min a un flujo de 4.6 mL/min que se unieron en diez fracciones cuaternarias (F3.12.1 a F3.12.10). La fracción cuaternaria F3.12.6 (1.5 mg) se identificó como el ácido tricodérmico C (**50**, **Figura 20**).

Por otro parte, en la fracción secundaria F5 (129 mg) se formaron espontáneamente cristales transparentes que se recristalizaron en MeOH y se decantaron. El precipitado (40.1 mg) se identificó como ácido tricodérmico o AMF-14 (**51**, **Figura 20**). La identidad de los compuestos **48-51** se determinó a través del comparativo de sus contantes físicas, su información espectrométrica y espectroscópica con investigaciones previas.<sup>166-172</sup> El diagrama de separación puede consultarse en el **Anexo 10**.



Figura 20. Compuestos aislados de IQ-819

Tricodermamida A (**48**): cristales transparentes; descomposición térmica a partir de 206-208 °C; HR-DART, m/z 433.1253 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, 433.1247,  $\Delta$  1.4 ppm); [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +134.29 (*c* 0.14, MeOH); la información de RMN puede consultarse en el **Cuadro 5** y los espectros del **Anexo 28** al **Anexo 32**.

Ácido tricodérmico A (**49**): solido blanco; punto de fusión 104-106 °C; HR-DART, *m/z* 321.2067  $[M+H]^+$  (calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, 321.2065,  $\Delta$  0.6 ppm);  $[\alpha]^{25}_{D}$  +50.94 (*c* 0.70, MeOH); la información de RMN se reporta en el **Cuadro 6** y los espectros del **Anexo 33** al **Anexo 37**.

Ácido tricodérmico C (**50**): cristales transparentes; HR-DART, m/z 303.1949 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>, 303.1960,  $\Delta$  -3.6 ppm); la información de RMN puede consultarse en el **Cuadro 6** y los espectros del **Anexo 38** al **Anexo 42**.

Ácido tricodérmico (**51**): cristales transparentes; punto de fusión 216-218 °C; HR-ESI+-QTOF, *ml z* 305.2130 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub>, 305.2116,  $\Delta$  4.6 ppm); [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> +50.00 (*c* 0.14, MeOH); la información de RMN se halla en el **Cuadro 6** y los espectros del **Anexo 43** al **Anexo 46**.

		Trico	dermamid	a A ( <b>48</b> )
Posicion	Tipo de carbono	$\delta_{c}$	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad
3	С	151.3		
4	CH <sub>2</sub>	24.5	2.73	dd, <i>J</i> = 19.3, 2.3
			2.27	d, <i>J</i> = 19.3
4a	С	69.1		
5	CH	75.0	4.48	dc, J= 5.1, 2.5
6	CH	130.9	5.60	dt, <i>J</i> = 10.4, 2.1
7	CH	129.0	5.55	dt, <i>J</i> = 10.4, 2.3
8	CH	68.1	4.23	ddt, J= 7.9, 5.4, 2.7
8a	CH	85.7	4.15	dd, <i>J</i> =7.8, 2.3
2'	С	159.1		
3'	С	122.6		
4'	CH	124.0	8.60	S
4'a	С	115.3		
5'	CH	123.7	7.42	d, <i>J</i> = 8.7
6'	CH	111.0	7.13	d, <i>J</i> = 8.7
7'	С	155.4		
8'	С	137.2		
8'a	С	145.1		
9'	CH3	57.0	3.96	S
10'	CH3	61.5	3.92	S
-CONH-	С	162.4		
-CONH-			9.40	S
4a-OH			2.76	S
5-OH			4.53	d, <i>J</i> =4.9
8-OH			4.62	d, <i>J</i> = 5.7

Cuadro 5. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 48

Análisis de RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz. Adquisiciones en CD<sub>3</sub>(CO)CD<sub>3</sub>.

		Ácido tricodérmico A ( <b>49</b> )			1	Ácido trico	odérmic	co C ( <b>50</b> )	Ácido tricodérmico ( <b>51</b> )			nico ( <b>51</b> )
Posición	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Multiplicidad	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{H}$	Multiplicidad	Tipo de carbono	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{H}$	Multiplicidad
1	С	172.8			С	172.6			С	172.7		
2	С	124.4			С	126.8			С	124.2		
3	СН	140.7	7.29	d, /= 12.1	CH	139.8	7.18	d, <i>J=</i> 11.3	CH	140.9	7.29	dd, J= 11.0, 1.6
4	СН	124.7	6.29	dd, J= 14.9, 11.2	СН	125.7	6.35	dd, <i>J =</i> 15.0, 11.3	CH	124.6	6.28	dd, J= 15.0, 11.1
5	СН	149.1	6.19	dd, J= 14.1, 10.5	СН	149.3	6.18	dd, <i>J</i> = 15.0, 10.6	CH	149.5	6.20	dd, J= 15.0, 10.5
6	CH₃	12.5	1.94	d, <i>J</i> = 1.4	CH₃	12.8	1.91	d, <i>J</i> = 1.3	CH₃	12.5	1.94	d, <i>J</i> = 1.5
1'	СН	49.7	2.51	ddd, J= 10.5,	СН	51.1	2.54	ddd, <i>J</i> = 10.6,	CH	50.0	2.50	ddd, <i>J</i> = 10.5,
				9.1, 5.5				9.1, 5.5				9.1, 5.5
2'	СН	36.7	2.22	m	СН	37.63*	2.22	m	CH	36.7	2.22	qt, J= 7.2, 5.2
3'	СН	133.2	5.61	ddd, <i>J</i> = 9.6, 4.4,	СН	133.9	5.62	ddd, <i>J</i> = 9.6, 4.4,	СН	132.9	5.59	ddd, J= 9.6, 4.4,
				2.7				2.8				2.8
4'	СН	131.1	5.45	dt, J= 9.5, 2.0	СН	132.7	5.43	dt, <i>J =</i> 9.5, 2.1	CH	131.6	5.46	dt, J= 9.6, 2.0
4'a	СН	41.6	1.92	sbp.	СН	37.99*	2.28	ddt, <i>J =</i> 12.9,	СН	42.0	1.88	ddt, J= 12.8,
								10.3, 2.6				10.2, 2.7
5'	$CH_2$	33.1	1.67	dt, J=13.1, 3.5	$CH_2$	45.0	1.26	t, J= 13.5	CH <sub>2</sub>	39.4	1.76	dt, J= 13.3, 3.5
			0.91	c, /= 12.9			1.78	dd, <i>J</i> = 13.7, 3.3			0.97	sbp.
6'	СН	45.5*	1.76	m	С	72.4			CH	39.7	1.49	m
7'	СН	81.9	3.15	t, J= 9.6	СН	81.8	2.83	d, <i>J</i> = 10.0	СН	82.4	2.74	t, J=9.6
8'	СН	43.9	1.41	ddc, /= 10.6, 9.5,	СН	40.4	1.57	tc, <i>J =</i> 10.3, 6.3	СН	44.0	1.32	m
				6.3								
8'a	СН	45.3*	1.05	sbp.	СН	47.2	1.05	sbp.	СН	46.0	1.09	sbp.
9'	CH <sub>2</sub>	68.8	3.66	dd, <i>J</i> = 10.7, 8.7	CH₃	28.0	1.24	S	CH₃	19.2	1.04	d, <i>J</i> = 6.5
			3.75	dd, <i>J</i> = 10.7, 3.7								
10'	CH₃	17.5	1.08	d, /=6.4	CH₃	18.6	1.08	d, <i>J</i> = 6.4	CH₃	18.2	1.08	d, <i>J</i> = 6.4
11'	CH₃	16.6	0.96	d, <i>J</i> = 7.1	CH₃	17.0	0.98	d, <i>J</i> = 7.1	CH₃	16.7	0.96	d, <i>J</i> =7.1

Cuadro 6. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 49, 50 y 51

\*, \* Asignamientos intercambiables.

sbp.: Señal sobrepuesta.

Análisis de RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz. Adquisiciones de **49** y **51** en CDCl<sub>3</sub> y **50** en metanol deuterado CD<sub>3</sub>OD.

## Compuestos aislados de la cepa IQ-814

El extracto de escala media (5.1 g) se fraccionó mediante separación por partición líquido-líquido, obteniéndose las fases agua-MeOH 8:2 (3.1 g), MeCN-MeOH 1:1 (472.5 mg) y hexano (699 mg). A continuación, la fase MeCN-MeOH se adsorbió en una mezcla de celita® (2 g) y gel de sílice (6.7 g) para fraccionarse mediante cromatografía rápida en fase reversa. Se empleó un sistema de elusión a 10 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 12 min, seguido por ajustes hasta alcanzar 100% de MeCN en 43.7 min y un lavado con MeOH por 42 min; el gradiente se detalla en el Anexo 7. Se obtuvieron ocho fracciones secundarias. Posteriormente, la fracción secundaria F3 (86.3 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos preparativa a razón de dos eluciones; la muestra se inyectó disuelta en dioxano-MEOH 1:1 a una concentración de 123.3 mg/mL. El gradiente que se aplicó a un flujo de 15 mL/min fue MeOH y agua ácida 40:60 $\rightarrow$ 73:27 en 20 min, que prosiguió con un lavado con MeOH. Los eluatos se agruparon en doce fracciones terciarias. La fracción terciaria F3.8 (9.2 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos semipreparativa. Esta se inyectó a una concentración de 61.3 mg/mL en dioxano-MeOH y se eluyó con un sistema de MeCN y agua ácida 45:55→70:30 en 30 min a un flujo de 4.6 mL/min, del que se obtuvieron seis fracciones. La fracción cuaternaria F3.8.4 (2.2 mg) se elucidó según se explica en el apartado de Resultados y discusión cómo (E)-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol (52, Figura 21). El diagrama de separación puede consultarse en el Anexo 11.



(*E*)-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol (**52**)

Figura 21. Compuesto aislado de IQ-814

(*E*)-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol (**52**): líquido amarillo; HR-ESI-QTOF, *m/z* 229.1812 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (calculado para  $C_{13}H_{25}O_3$ , 229.1803,  $\Delta$  3.9 ppm; **Anexo 47**);  $[\alpha]^{25}_D$  +11.67 (*c* 0.06, MeOH); la información de RMN se reporta en el **Cuadro 7** y los espectros del **Anexo 48** al **Anexo 53**.

Posición -		(E)-tridec-	/-eno-3,5	6,6,10-tetraol ( <b>52</b> )
1 03101011	Tipo de carbono	$\delta_{c}$	$\delta_{H}$	Multiplicidad
1	CH₃	10.3	0.94	t, <i>J</i> =7.4
2	$CH_2$	29.7	1.56	ddd, J= 13.7, 7.5, 6.4
			1.71	ddd, J= 13.9, 7.5, 6.6
3	СН	79.0	4.00	dc, <i>J</i> = 7.9, 6.7
4	$CH_2$	39.8	1.63	ddd, <i>J</i> = 12.7, 7.7, 6.5
			2.35	dt, J= 12.6, 6.8
5	СН	76.8	4.11	td, J= 6.6, 5.3
6	СН	85.3	4.15	t, <i>J</i> =6.1
7	СН	131.9	5.55	ddt, J= 15.3, 7.0, 1.3
8	СН	130.1	5.78	dddd, J= 15.5, 7.7, 6.8, 1.1
9	$CH_2$	40.5	2.28	m
			2.16	dt, J= 15.4, 7.6
10	СН	70.8	3.67	m
11	CH <sub>2</sub>	39.1	1.45	sbp.
12	$CH_2$	19.0	1.36	c, <i>J</i> = 7.5
			1.45	sbp.
13	CH₃	14.2	0.93	t, <i>J</i> = 7.1

Cuadro 7. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 52

sbp.: Señal sobrepuesta.

Análisis de RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz. Adquisiciones en CDCl<sub>3</sub>.

#### Compuestos aislados de la cepa IQ-807

El extracto de escala media (1.8 g) se fraccionó mediante separación por partición líquido-líquido, obteniéndose las fases agua-MeOH 8:2 (350.6 mg), MeCN-MeOH 1:1 (459.1 mg) y hexano (997.1 mg). A continuación, la fase MeCN-MeOH se adsorbió sobre una mezcla de celita (2 g) y gel de sílice (3.2 g) para fraccionarse por cromatografía rápida en fase reversa. Como fase móvil se empleó un sistema de elución a 10 mL/min que consistió en un flujo isocrático de MeCN y agua ácida 5:95 por 12 min, seguido de un gradiente hasta alcanzar el 100% de MeCN en 42.5 min y finalizar con un lavado con MeCN y MeOH; el gradiente se describe por completo en el Anexo 7. Se obtuvieron siete fracciones secundarias. Posteriormente, la fracción secundaria F1 (50.2 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos preparativa; la muestra se inyectó disuelta en dioxano-MeOH 1:1 a una concentración de 111.6 mg/mL. El gradiente que se aplicó a un flujo de 14 mL/min fue MeOH y agua ácida 20:80→76:24 en 26 min, que prosiguió con un lavado con MeOH. Los eluatos se agruparon en doce fracciones terciarias. La fracción terciaria F1.5 (14.5 mg) se separó mediante cromatografía de líquidos semipreparativa. Esta se inyectó a una concentración de 45.3 mg/mL en dioxano-MeOH y se eluyó con un sistema de MeCN y agua ácida 45:55→68:32 en 20 min a un flujo de 4.6 mL/min. Se obtuvieron cinco fracciones cuaternarias. La fracción cuaternaria F1.5.2 (11.7 mg) se identificó como iso-cladospólida B (53, Figura 22) tomándose en consideración la información espectrométrica y espectroscópica disponible.<sup>173,174</sup> El diagrama de fraccionamiento se presenta en el **Anexo 12**.



Figura 22. Compuesto aislado de IQ-807

*iso*-Cladospolida B (**53**): sólido blanco; punto de fusión 86-87 °C; HR-ESI-QTOF, *m/z* 229.1448  $[M+H]^{+}$  (calculada para C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>, 229.1439,  $\Delta$  3.9 ppm); la información de RMN se reporta en el **Cuadro 8** y los espectros del **Anexo 54** al **Anexo 57**.

Docioión	<i>iso</i> -Cladospolida B ( <b>53</b> )								
FUSICION	Tipo de carbono	$\delta_{c}$	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad					
2	С	172.9							
3	СН	123.0	6.19	dd, <i>J</i> = 5.7, 2.1					
4	СН	153.7	7.45	dd, J= 5.8, 1.6					
5	CH	86.2	4.98	dt, <i>J</i> = 4.7, 1.8					
6	CH	72.0	3.75	dt, J= 6.5, 4.8					
7	CH <sub>2</sub>	33.3	1.6	m					
8	CH <sub>2</sub>	29.5	1.33-1.39	m					
9*	CH <sub>2</sub>	25.55	1.39-1.48	m					
10*	CH <sub>2</sub>	25.72	1.54	m					
11	CH <sub>2</sub>	39.3	1.46	m					
12	СН	68.2	3.80	m					
13	CH₃	23.7	1.19	d, J= 6.1					

Cuadro 8. Información de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de 53

\* Asignamientos intercambiables.

Análisis de RMN <sup>13</sup>C a 175 MHz y RMN <sup>1</sup>H a 700 MHz. Adquisiciones en CDCl<sub>3</sub>.

## Análisis estadísticos

Los análisis se realizaron con IBM SPSS Statistics versión 30 (IBM®, Armonk, Nueva York, EUA). Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad. La prueba de Levene se utilizó para determinar la igualdad de varianzas. Para la significación estadística se consideró un valor de p < 0.05. Las gráficas se realizaron con Prism 8 (GraphPad Software; Boston, Massachusetts, EUA); los diagramas de Sankey fueron creados con SankeyMATIC y los diagramas de Venn en una página electrónica del VIB-UGent Center.<sup>175,176</sup>

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Hormigas y hormigueros bajo estudio

La búsqueda de hormigueros activos a nivel del suelo, en el bosque de niebla de la región central de Veracruz en México, condujo a la recolección de 18 muestras de hormigas y 36 muestras de tierra, divididas en 17 de los alrededores del nido, 17 de los hormigueros y 2 de las áreas de tránsito. Sin embargo, debido a la actividad humana el bosque está dividido en fragmentos por lo que los puntos de colecta fueron una reserva natural y varios espacios modificados caracterizados por su vegetación: cafetales, un potrero, un parque ecológico y un camino agrícola, de los cuales los primeros dos son los menos modificados (**Figura 12**).<sup>177,178</sup> Las especies de hormigas identificadas fueron *Solenopsis geminata, Atta mexicana, Dorymyrmex bicolor, Nomamyrmex esenbeckii, Cheliomyrmex morosus y Camponotus sericeiventris*, que se clasifican en las familias *Mymicinae, Dolichoderinae, Ecitoninae y Formicinae* (**Figura 23** y **Anexo** 1). Los nidos de *S. geminata* y *A. mexicana* fueron los más abundantes, al sumar más de la mitad de los puntos registrados, en concordancia con los registros previos para la zona de estudio.<sup>94</sup>



Imágenes procedentes de AntWeb v8.87.<sup>179</sup>

Figura 23. Clasificación taxonómica de las especies de hormigas recolectadas

Las variaciones en el estilo de vida de las hormigas, la forma y el tamaño de sus nidos impactaron positivamente en la diversidad de los puntos muestreados y, en consecuencia, de la micobiota bioprospectada. *N. esenbeckii y C. morosus* de la subfamilia *Ecitoniane* son llamadas hormigas "legionarias" y debido a que no anidan en el suelo se tomó tierra de sus áreas de tránsito o caminos. De *S. geminata* la muestra de tierra representó de forma íntegra sus nidos, pero de *A. mexicana* se muestreó por separado la parte externa e interna, esto es, el montículo y sus túneles; ambas especies están clasificadas en *Myrmicinae*. De *D. bicolor*, subfamilia *Dolichoderinae*, se muestreó un montículo correspondiente a la porción externa de su hormiguero. El sitio de anidación de la hormiga "carpintera" *C. sericeiventris*, subfamilia *Formicinae*, no fue considerado dado que esta anida en los árboles.

#### Colección de morfotipos fúngicos

Del proceso de aislamiento se obtuvieron 698 cultivos fúngicos axénicos, así como 35 cultivos no axénicos cuya separación excedía el tiempo disponible para esta fase del proyecto y 59 cultivos que perdieron viabilidad antes de su aislamiento. En cuanto a la colección de cultivos o morfotipos axénicos, de las muestras de tierra se aislaron 666 hongos filamentosos y cuatro de consistencia mucoide, mientras que de los endógenos fueron 28 filamentosos (Cuadro 9 a Cuadro 11). De acuerdo con lo observado durante el proceso de aislamiento, los hongos endógenos crecieron particularmente lento respecto al resto. En general, por cada muestra de tierra se obtuvieron en promedio 18 morfotipos filamentosos y de las hormigas cuatro; los mucoides se aislaron mayormente de tierra de montículos de A. mexicana. Es importante indicar que en cuanto al aislamiento de hongos entomógenos, no se aislaron morfotipos del interior de las hormigas S. geminata y D. bicolor, proponiéndose que el tiempo de esterilización del exoesqueleto según se describe en los Métodos resultó excesivo para estas hormigas pequeñas. La colección de morfotipos es la primera en abordar la micobiota cultivable de hormigas y hormigueros en áreas modificadas y conservadas del bosque de niebla, asimismo, también lo es desde el punto de vista de las especies de hormigas, a excepción de *A. mexicana.*<sup>9,180,181</sup> Aunque, por otro lado, sí hay reportes sobre los hongos filamentosos del suelo del bosque de niebla en la región central de Veracruz. La población de micromicetos se ha descrito como rica, diversa, equitativa, con un alto recambio y varios organismos exclusivos entre sitios, mientras que el estudio de los hongos macroscópicos ha llevado al descubrimiento de especies nuevas.<sup>182-184</sup> En lo que concierne a especies de hormigas, los reportes más cercanos a nivel de género tratan la

micobiota de *Solenopsis invicta* en colonias en EUA y China, así como entomopatógenos de varias especies de *Camponotus*.<sup>185-189</sup>

Especie de hormiga	Tipo de vegetación	Sitio de muestreo	Nido	Cantidad de morfotipos	
	Cofotol	Hacienda	14	1	
	Caletat	El Trianón	17	1	
Alla mexicana	Camino	Localidad	10	1	
	agrícola	La Orduña	10	I	
Salanansis dominata	Cafatal	Finca	Б	1	
Solenopsis gerninala	Caletat	Los Magueyes	5	1	

Cuadro 9. Morfotipos mucoides aislados del suelo

Espacia da	Tino do	Sitio do	Cantidad d	Cantidad de morfotipos por origen				
bormigo	npo de	Sitio de	Nido	Del montículo o	De los	De los		
norringa	vegetacion	muestreo		sitio de tránsito	túneles	alrededores		
		Donoho	2	20	-	18		
	Potrero	Rancho El Águilo	4	19	-	17		
		El Aguila	1	19	-	23		
		Finca	5	32	-	34		
	Cofotol	Los Magueyes	6	30	-	34		
Solenopsis geminata	Caletat	Hacienda El Trianón	13	23	-	20		
	Bosque de niebla	Reserva natural	7	13	-	14		
	Parque ecológico	Parque ecológico El Haya	16	21	-	21		
			_	Subtotal: 177	-	Subtotal: 181		
	0		9	23	-	15		
	Camino	Localidad	10	17	-	15		
Atta mexicana	agricola	La Orduna	11	14	-	13		
		Hacianda	14	8	7	19		
	Cafetal	Fl Trianón	15	16	-	11		
		LUMANON	17	12	20	12		
				Subtotal: 90	Subtotal: 27	Subtotal: 85		
Dorymyrmex bicolor	Potrero	Rancho El Águila	3	12	-	21		
Nomamyrmex esenbeckii	Bosque de niebla	Reserva natural	8	20	-	18		
Camponotus morosus	Cafetal	Hacienda El Trianón	12	20	-	15		

# Cuadro 10. Morfotipos filamentosos aislados del suelo

Se aislaron un total de 666 morfotipos: 279 provienen de montículos, 40 de áreas de tránsito, 27 de túneles y 320 del terreno circundante. Adicionalmente, 35 morfotipos no lograron ser aislados mediante resiembras y 57 fueron inviables bajo las condiciones de crecimiento.

Especie de hormiga	Tipo de vegetación	Sitio de muestreo	Hormiga	Cantidad de morfotipos
	Comino ogríagla	Localidad	14	4
Atta maviaana		La Orduña	17	4
Alla mexicana	Cofotol	Hacienda	9	2
	Caletat	El Trianón	10	12
				Subtotal: 22
Camponotus	Camino agrícola	Localidad	18	Λ
sericeiventris	Odmino agricota	La Orduña	10	4
Nomamyrmex	Bosque de nieble	Reserve natural	Q	1
esenbeckii	Dosque de media	neselva natulat	0	Ι
Cheliomyrmex	Cafetal	Hacienda	10	1
morosus	Galetat	El Trianón	12	Ι

#### **Cuadro 11.** Morfotipos filamentosos aislados de hormigas

Se aislaron un total de 28 morfotipos. Adicionalmente, 2 fueron inviables bajo las condiciones de crecimiento.

#### Colección de extractos

La colección de 252 extractos orgánicos se conformó a partir de los cuatro morfotipos mucoides y 248 filamentosos, los últimos consistentes en casi todos los endógenos de hormigas (25) y una porción de los aislados de la tierra (223, **Figura 24**); aunque otros 22 morfotipos también fueron considerados, pero no se desarrollaron en el medio de crecimiento. Por su elevado número sólo el 33.5% de los morfotipos filamentosos aislados de la tierra se cultivó, aplicándose para tal fin un muestreo estratificado proporcional que conservó representadas las variables acerca del origen del morfotipo: la especie de hormiga, la vegetación asociada y el punto de muestreo por nido, área de tránsito o alrededor (**Anexo 2**). Los morfotipos filamentosos fue de 2.9 a 158.3 mg de extracto por gramo de cereal y el de los mucoides fue de 2.4 a 234.8 mg por litro de caldo PD (**Anexo 2**). El menor rendimiento de cultivo de algunos morfotipos puede explicarse principalmente por el pobre ajuste de las condiciones de crecimiento y el medio de cultivo a los requerimientos del microorganismo; lo cual se acentuó en los que fueron incapaces de crecer en cereal en la fase de escalamiento.<sup>190,191</sup>



Distribución de los morfotipos bioprospectados según el aspecto de su colonia (A) y origen de los morfotipos mucoides (B) y filamentosos (C) por especie de hormiga a la que se asocian. En paréntesis se indica el total de morfotipos representados.



## Actividad antibacteriana

La actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano fue determinada para la colección de extractos, contra dos patógenos Gram negativos a una concentración de 250 ppm. Varios hongos filamentosos fueron bioactivos, pero ninguno de los mucoides fue destacable. Se descubrió que el desempeño de los hongos filamentosos fue mejor contra la cepa de *A. baumannii* multirresistente, que contra *K. pneumoniae* hipervirulenta; el valor máximo de inhibición sobre la primera fue del 73.4% y contra la segunda del 34.7%. Además, 222 extractos inhibieron a la primera bacteria y 128 a la segunda (**Figura 25A**). Las comparaciones estadísticas acerca de la bioactividad frente a *A. baumannii* de los morfotipos filamentosos, según el punto de muestreo, no evidenciaron diferencia entre las medianas cuando el comparativo se limitó a las especies de hormigas mejor representadas: *S. geminata* y *A. mexicana* (**Figura 25C**). Varios estudios han reportado que las comunidades fúngicas difirieren entre los hormigueros y el suelo, sin embargo, en esta investigación esa diferencia no se ve reflejada en la bioactividad de sus extractos.<sup>9,192</sup>


Comparativa sobre la bioactividad de los morfotipos, una línea conecta al mismo hongo (**A**). Las gráficas de violín comparan el efecto en relación con el origen del morfotipo (**B** y **C**), las medianas de los grupos no difieren estadísticamente (prueba de Kruskal-Wallis, p = 0.13 en **B** y p= 0.09 en **C**). Las gráficas de barras (**D** y **E**) muestran los diez valores de inhibición más altos por patógeno, se reporta el promedio y la desviación estándar de mínimo un triplicado; los asteriscos señalan los morfotipos asociados con hormigueros. Muestras evaluadas a una concentración final de 250 µg/mL, el control positivo fue gentamicina en agua a 64 mg/L (C1+) y en DMSO a 8 mg/L (C2+); también colistina en agua a 20 µg/mL (C3+). C-: control negativo. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 25. Inhibición del crecimiento bacteriano por los morfotipos bioprospectados

Los mejores porcentajes de inhibición (media ± desviación estándar) contra A. baumannii corresponden a los morfotipos IQ-1129 (73.4 ± 3.2%) e IQ-814 (66.7 ± 3.8%), cuyo efecto difirió de manera estadísticamente significativa de entre los 10 mejores porcentajes (análisis de varianza de Welch, p < 0.05; *pos hoc* prueba de Games-Howell al 95% de nivel de confianza; **Figura 25D**). En cambio, contra K. pnuemoniae no puede destacarse ninguno de entre los 10 mejores resultados (análisis de varianza de Welch, p < 0.05; *pos hoc* prueba de Games-Howell al 95% de nivel de confianza; Figura 25E). Los morfotipos asociados con los 10 extractos de mayor actividad biológica contra A. baumannii provienen según su punto de muestreo de los alrededores (5), los montículos (3), los sitios de tránsito (1) y los túneles (1); mientras que por la especie de hormiga se asociaron con S. geminata (6), A. mexicana (2), D. bicolor (1) y C. morosus (1); finalmente, en cuanto a la vegetación del área de muestreo provinieron de los cafetales (4), del potrero (3), del bosque de niebla (2) y de un parque ecológico (1). Se ha propuesto que las actividades agrícolas y humanas provocan un incremento de la abundancia de genes de resistencia en las bacterias del suelo, debido a su exposición a los antibióticos; especulamos que esto puede explicar porque algunos de los mejores morfotipos contra *A. baumannii* provienen de áreas perturbadas.<sup>194,195</sup> En cuanto a A. mexicana, puede sospecharse que la actividad antibacteriana de los extractos de su micobiota no sobresalió debido a la sanitización que las hormigas aplican al interior de sus nidos para controlar la población fúngica; también porque su cutícula es un reservorio de Acinetobacter spp. y *Klebsiella* spp., lo que puede reflejar un ambiente propicio para estas bacterias al interior de los nidos.<sup>196</sup> Los resultados de bioactividad presentados son de los primeros en evaluar la susceptibilidad de las bacterias multirresistentes a la micobiota de las hormigas en estudio.

#### Análisis metabolómico no dirigido

La diversidad química de la colección de extractos se visualizó en redes moleculares clásicas, de manera separada para los hongos filamentosos y mucoides (**Figura 26**). En general, en un análisis por redes moleculares la composición química se representa como nodos, que son en realidad un espectro de masas consenso. Cada espectro consenso es creado a partir del alineamiento de la fragmentación secundaria correspondiente, en los análisis de espectrometría de masas en tándem de los extractos; la similitud entre los espectros consenso determina la unión de los nodos con aristas. Cada nodo puede interpretarse como un presunto compuesto y las redes de estos indican que comparten una base estructural. La puntuación de coseno mide la similitud entre pares de espectros desde cero a uno, 1 significa que la fragmentación es idéntica. Los

análisis de tipo clásico adolecen de representar como nodos diferentes los aductos de una misma molécula, pero en general, son útiles para representar la diversidad química.<sup>150</sup>



Red de morfotipos filamentosos (**A**) y mucoides (**B**). Las redes formadas por al menos tres nodos con el mismo origen están encerradas en un ovalo punteado. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 26. Red molecular global de los morfotipos bioprospectados

El análisis por redes moleculares de los hongos mucoides refleja la diversidad química de cuatro morfotipos, la mayoría provenientes de montículos de A. mexicana. Dada la inactividad biológica, su estudio químico todavía puede ser valioso para otras investigaciones ya que ninguno de los 58 nodos fue identificado de manera presuntiva. Por otro lado, las redes de los hongos filamentosos se componen de 3036 nodos, provenientes de 248 morfotipos, la mayoría clasificables como probables moléculas pequeñas (Figura 27A).<sup>197</sup> El 35.8% de los nodos son solitarios, es decir, que el espectro consenso difirió lo suficiente del resto y podrían considerarse estructuras inusuales, mientras que el 64.2% se organiza en redes, interpretables como grupos de derivados estructurales. Son de importancia los nodos cuyos morfotipos asociados comparten origen y que constituyen una diversidad química exclusiva (1863), solo accesible a través del estudio químico de los hongos aislados de un punto del nido o los alrededores (Figura 27B); con morfotipos de diversos orígenes se asociaron 1173 nodos. Al respecto, la diversidad química exclusiva de la micobiota de los montículos y los alrededores se halló similar en magnitud, según el comparativo de la cantidad de nodos, de redes y de aristas por nodos (Figura 27C); la composición de los hongos de los túneles, las áreas de tránsito y los endógenos no pudo contrastarse debido a su subrepresentación en la colección fúngica. También son aprovechables desde un punto de vista químico.



La gráfica de dispersión muestra en orden ascendente la relación m/z de los iones precursores de todos los nodos (A). El diagrama de Venn refleja la distribución de los nodos según el origen de su morfotipo asociado (B). La gráfica de columnas representa el porcentaje de nodos exclusivos en relación con el número de aristas que poseen (C). Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 27. Atributos de los nodos y las aristas de la red molecular global

A partir de 16 hongos filamentosos se identificaron promisoriamente 15 metabolitos secundarios clasificables mayoritariamente como policétidos, alcaloides y péptidos cuyo núcleo estructural incluye meroterpenos, xantonas, antraquinonas, naftalenos, esteroides, poliprenoles, azafilonas, dipéptidos, cumarinas, por mencionar algunos ejemplos (Figura 28 y Anexo 5). Cabe decir que este análisis desreplicativo no asegura la identificación del estereoisómero disponible en la librería por lo que no se indica en las estructuras dibujadas. Además, las identificaciones presuntivas siempre requerirán evidencia experimental para asegurar la presencia de la molécula en el extracto. Los compuestos identificados fueron pirenocina A (54), secosterigmatocistina (55), versiconol (56), oxalicina B (57), deacetilcloronectrina (58), LL-Z 1272  $\varepsilon$  (59), azafilona 60, policétido cíclico 61, triterpenoide tipo oleanano 62, SCH 60059 (63), asperversiamida F (64), fonsecina (65), 1',2'-deshidropenicillida (66), vermixocina A (67), y austálida 68. Cabe mencionar que los nodos de algunos compuestos forman parte de redes y por tal razón sus correspondientes morfotipos son candidatos para encontrar derivados estructurales. No obstante, puede notarse que ciertas moléculas similares no forman parte de la misma red (55-56 y 66-67), esto se debe a que el algoritmo de agrupación de GNPS no es óptimo para todos los casos cuando se construyen las redes. La dereplicación facilitó la identificación de varios morfotipos cuyo estudio químico no fue considerado porque podrían llevar al aislamiento de moléculas conocidas, pero al mismo tiempo incrementó el conocimiento sobre la probable composición de los hongos del suelo del bosque de niebla y de los provenientes de hormigueros y hormigas.

La diversidad química se unificó con la información biológica mediante el mapeo de la actividad de compuestos, realizado con la plataforma NP Analyst y que identifica los iones precursores de las supuestas moléculas bioactivas.<sup>155</sup> En este tipo de red de bioactividad los morfotipos se representan por nodos cuadrados y los iones precursores por nodos circulares, unidos entre sí por aristas cuando están relacionados. La predicción se mide en dos puntajes, que se codifican en el tamaño y el color de los nodos circulares. El tamaño del nodo incrementa con el puntaje de actividad, que mide la intensidad de la actividad biológica predicha, y el color se oscure a mayor puntaje de agrupamiento, el cual mide la similitud del efecto biológico entre los extractos que poseen la relación *m/z*. De acuerdo con los creadores de NP Analyst, para el rastreo de los compuestos bioactivos se prefieren puntajes altos.

57



Cada molécula se une a su nodo, en cuyo interior se indica la relación *m/z* del ion precursor. En las redes el coseno de similitud esta codificado en el grosor de las aristas. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 28. Compuestos presuntamente identificados en la red global

Debido a lo promisorio de los resultados, se mapeó la inhibición del crecimiento de *A. baumannii* por la colección de hongos filamentosos (**Figura 29**). Las redes correlacionaron 90 iones precursores con valores de 121 a 1804 *m/z*. Algunos nodos representaron hasta 50 morfotipos distintos y se les predijo una bioactividad baja, ya que el valor máximo del puntaje de bioactividad fue 0.7, pero el valor más alto posible fue 3. Una revisión de los nodos con puntajes de agrupamiento de 0 a 0.099 reveló relaciones *m/z* con buenas a moderadas predicciones de bioactividad (~1.7; **Figura 30**). De forma general, un puntaje de agrupamiento pequeño implica poca coherencia de la bioactividad a lo largo de los morfotipos en que se presentó la relación *m/z*, en este sentido, para el análisis significa que a la relación *m/z* se le predice su efecto en solo algunos de los morfotipos a estudiar químicamente, de entre los que destacaron las cepas IQ-1129, IQ-814 e IQ-1103. Sin embargo, ya que las aplicaciones de NP Analyst son limitadas dada su reciente publicación, este trabajo puso a prueba las predicciones para todos los compuestos aislados.



Únicamente se muestran los nodos (90) presuntamente bioactivos con un puntaje de agrupamiento y de bioactividad de mínimo 0.25 y 0.1, respectivamente. El nodo correspondiente al ácido tricodérmico A y C (**49** y **50**) esta señalado con una flecha (detectados como [2M+H]<sup>+</sup>). Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>





Se representan 276 nodos con un puntaje de agrupamiento de 0 a 0.099 y un puntaje de bioactividad de > 0.25. A y B representan el ácido penicílico (**46**) y deoxi-PF1140 (**45**), respectivamente. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 30. Diagrama de dispersión de iones precursores presuntamente bioactivos

#### Estudio químico

En consideración de la actividad inhibitoria del crecimiento de *A. baumannii*, el rendimiento de extracción advertido en la etapa de cribado, los compuestos desreplicados y la predicción de las relaciones *m*/*z* bioactivas, se seleccionaron los morfotipos IQ-1129, IQ-814, IQ-819, IQ-1038 e IQ-807 para ser estudiados químicamente (**Figura 18 y Figura 31**). De acuerdo con la determinación taxonómica basada en la región ITS4 del ADN, los hongos IQ-819, IQ-814 e IQ-807 corresponden a *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., y *Cladosporium* sp., de forma respectiva (**Anexo 3**). En cuanto a IQ-1129, IQ-1038 e IQ-1017, fueron identificados a nivel morfológico como ascomicetos, pero se requerirán estudios moleculares adicionales para profundizar en su clasificación (**Anexo 4**). El efecto inhibitorio de los extractos a mayor escala fue corroborado y la evaluación de sus fracciones primarias permitió enfocar el estudio a las de mediana polaridad (solubles en MeCN-MeOH 1:1; **Figura 32**). Un caso particular fue el de IQ-814, cuyo extracto perdió actividad, pero la recuperó una de sus fracciones primarias, tal vez debido a efectos antagónicos entre los múltiples componentes del extracto.<sup>198</sup> La actividad del morfotipo IQ-1038 se perdió desde el extracto, sin embargo, se optó por aislar su componente mayoritario más accesible (**Figura 15**).



Cada columna es un morfotipo sometido a estudio químico. De arriba abajo se describe su origen, su morfología en agar PD y en cereal Nestlé Honey Cheerios<sup>®</sup>. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>



Figura 31. Morfotipos seleccionados para su estudio químico

De cada morfotipo se reporta el efecto del extracto total del cultivo escalado y sus fracciones primarias en orden de polaridad creciente. Las muestras disueltas en DMSO se evaluaron a una concentración final de 250 µg/mL. Se gráfica el promedio de mínimo un duplicado y su desviación estándar. El extracto de la cepa IQ-1038 y sus fracciones primarias fueron inactivas. El control positivo (C+) consistió en gentamicina en DMSO a 64 mg/mL. C-: control negativo. CE: control de esterilidad.

Figura 32. Inhibición del crecimiento de A. baumannii por las fracciones primarias

Los fraccionamientos subsecuentes de las fracciones primarias condujeron al aislamiento de los compuestos PF1140 (44) y deoxi-PF1140 (45) del ascomiceto IQ-1129; el ácido penicílico (46) del ascomiceto IQ-1038; la brefeldina A (también llamada decumbina; 47) del ascomiceto IQ-1017; la tricodermamida A (48), el ácido tricodérmico A (49), el ácido tricodérmico C (50) y el ácido tricodérmico (también llamado AMF-14; 51) de Trichoderma sp. IQ-819; la iso-cladospolida B (53) de Cladosporium sp. IQ-807 y el nuevo polialcohol insaturado (E)-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol (52) de Clonostachys sp. IQ-814 (Figura 33). Los diagramas de fraccionamiento del Anexo 8 al Anexo 12 describen con más detalles el aislamiento de los compuestos; cabe señalar que se advirtió la transformación de 44 en 45 cuando se conservó disuelto en CDCl<sub>3</sub>. La identificación de los compuestos conocidos 44-51 y 53 se basó en el comparativo de sus puntos de fusión, su rotación óptica, sus constantes espectroscópicas de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y su masa exacta con lo reportado en la bibliografía (Anexo 13 al Anexo 57). En cambio, por su novedad, en seguida se describe brevemente la elucidación estructural de 52. La fórmula molecular de 52 se determinó como  $C_{13}H_{26}O_4$  con un grado de instauración, según se calculó a partir del ion [M+H-H2O]<sup>+</sup> observado en los análisis HRMS (Anexo 47). El análisis de los espectros de RMN <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H y HSQC reveló que la molécula se compone de dos grupos metilos, cinco grupos metilenos y seis grupos metinos. De acuerdo con sus desplazamientos químicos, dos de los grupos metinos están unidos a los carbonos de un doble enlace en posición trans ( $\delta_c/\delta_H$  131.9/5.5 y 130.1/5.7, J = 15.3 Hz), mientras que el resto pertenecen a cuatro oximetinos ( $\delta_c$  79.0, 76.8, 85.3 y 70.8). Ya que la molécula tiene un solo sistema de espín, su conectividad se estableció mediante el análisis de los espectros COSY y HMBC. La configuración relativa se estableció a partir de las correlaciones NOESY y el análisis de las constantes de acoplamiento. Los espectros de RMN de 52 pueden consultarse del Anexo 48 al Anexo 53.

La búsqueda de los compuestos aislados en el análisis por redes moleculares revela que en casi todos los casos sus nodos se unen por aristas con otros (**Figura 33**). En este sentido, el tamaño de la red en la que se encuentran permitió inferir la disponibilidad de varios derivados que pueden explorarse en investigaciones consecuentes de los morfotipos de la colección; excepto en el caso de **47**, únicamente hallado en la cepa IQ-1017 y que está representado por un nodo solitario. Cabe decir que **53** de *Clonostachys* sp. IQ-814 no aparece en el análisis por redes, tal vez como consecuencia de una pobre ionización bajo las condiciones espectrométricas empleadas y que llevó a su filtrado como ruido durante los análisis metabolómicos. Por otro lado, debido a la actividad antibacteriana del hongo IQ-1129 y de sus compuestos aislados según se explica en la

62

siguientes secciones, se realizó el marcaje manual de los derivados presuntivos de **44** y **45**. El nodo próximo a **44** con un coseno de similitud de 0.98 y una relación *m*/*z* 280.1902 (en el análisis espectrométrico de IQ-1129), se conjetura que corresponde al ion  $[M+H]^+$  de la deoxiakantomicina (**69**; calculado para C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>3</sub>, 280.1912, 3.6 ppm; **Figura 34**), que se reportó como un producto de degradación de **44** por De Silva y colaboradores (2009).<sup>160</sup> Adicionalmente, el nodo cercano a **45** con un coseno de similitud de 0.89 y una relación *m*/*z* 264.1586 (en el análisis espectrométrico de IQ-1039), no pudo identificarse como el ion  $[M+H]^+$  de ningún compuesto descrito en la literatura (calculado para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>, 264.1599, 4.9 ppm). Estos ejercicios de identificación presuntiva constatan la oportunidad de hallar otras piridinonas en la colección fúngica.



El número sobre las aristas indica el valor del coseno de similitud, que también se codifica en el grosor de las aristas. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Figura 33. Redes y nodos de los compuestos aislados



Figura 34. Deoxiakantomicina (69)

#### Acerca de los compuestos aislados

El compuesto **44** fue originalmente aislado de una especie de *Eupenicillium* en 1995 y patentado a raíz de su amplio efecto antifúngico contra una variedad de especies de *Candida*.<sup>161</sup> También se ha aislado de varias especies de *Penicillium*, se conoce su ruta biosintética y su configuración absoluta.<sup>160,199-204</sup> Se ha descrito su efecto fitotóxico *in vitro* sobre el fresno (*Fraxineus excelsior*) y la lechuga (*Lectuca sativa*), así como su efecto inhibidor del crecimiento del hongo fitopatógeno *Hymenoscyphus fraxineus*, de una variedad de líneas celulares de cáncer y de algunos microorganismos patógenos de interés en medicina, como *E. coli* cepa ATCC 9637 (CMI de 8.3 µg/mL) y el parásito intracelular *Mycoplasma genitalium* (CMI de 0.08 µg/mL).<sup>160,202-204</sup> El compuesto **45** fue aislado en 2009 a partir de *Penicillium* sp. de origen marino y fue inactivo en ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento bacteriano y de una línea celular de linfoma murino.<sup>160</sup> Actualmente, la familia química de las *N*-piridin-2-onas a la que pertenece **44** y **45** se compone de por lo menos otros 15 compuestos (**Figura 35**), de entre los que podemos destacar a la cordypiridona D (**79**) por su efecto antibacteriano *in vitro*, con una CMI de 62.5 µg/mL contra *S. aureus* cepa ATCC 29213; **63** se aisló de *Penicillium nothofagi* endófito de la conífera *Abies beshanzuensis*.<sup>205</sup>

El compuesto **46** es una micotoxina descrita entre los años 1910 y 1913, comúnmente aislada de muchas especies del género *Penicillium*; su actividad citotóxica y antimicrobiana *in vitro* es conocida, pero se trata de un metabolito indeseable dada su toxicidad contra los mamíferos.<sup>206-209</sup> La lactona **47** fue asilada originalmente del hongo del suelo *Penicillium decumbens* en 1958, posee *in vitro* actividad antifúngica, antiviral, fitotóxica, citotóxica y antiinflamatoria.<sup>210-213</sup> Su configuración absoluta se ha determinado por cristalografía de rayos X, su síntesis y biosíntesis también han sido publicadas.<sup>164,214,215</sup> Recientemente, su capacidad para bloquear el tráfico de proteínas entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico en cultivos celulares lo ha convertido en un reactivo útil en investigaciones sobre sistemas de secreción.<sup>215-217</sup>



Reportados por Silva *et al.*, 2009 (**75**)<sup>160</sup>; Isaka *et al.*, 2001(**70,71**, **77**, **79**)<sup>218</sup>; Teshima *et al.*, (**72**)<sup>219</sup>; Cai *et al.*, 1999 (**73**);<sup>220</sup> Wagenaar *et al.*, (**74**)<sup>221</sup>; Mcbrien *et al.*, 1996 (**76**)<sup>222</sup>; Zhu *et al.*, 2022 (**78**)<sup>205</sup>; Qiao *et al.*, 2019 (**80**)<sup>223</sup>; Wu *et al.*, 2014 (**81**, **82**)<sup>224</sup>; TePaske y Gloer, 1991 (**83**)<sup>225</sup> Chaowei *et al.*, 2003 (**84**)<sup>226</sup>.

Figura 35. N-piridin-2-onas de origen natural

Los compuestos **48-51** se han encontrado en varias especies del género *Trichoderma*.<sup>166,167,171</sup> El dipéptido cíclico **48** se describió en el 2003 a partir de *Trichoderma virens* y años después de *Trichoderma harzianum, Trichoderma* cf. *brevicompactum, Spicaria elegans, Penicillium janthinellum* y otros hongos; se le ha evaluado *in vitro* como citotóxico contra líneas de cáncer humano, inhibidor de la acetilcolinesterasa y de la lipasa pancreática, pero no presentó un efecto significativo. <sup>166,167,227-229</sup> Estructuralmente, **48** posee una rara oxazadecalina.<sup>230</sup> El compuesto **51** se describió en 2005, publicándose en una patente su aislamiento a partir de *Trichoderma* sp. cepa NFS-932 y su aplicación como inhibidor de la expresión de ICAM-1, una proteína de adhesión intercelular empleada como blanco molecular para el tratamiento de enfermedades

inflamatorias.<sup>170</sup> Además, se reportó su actividad citotóxica *in vitro* contra varias líneas celulares de cáncer, así como la inhibición de bacterias patógenas para el humano y de hongos fitopatógenos, como Botrytis cinera (CMI de 4 µg/mL).<sup>171,231,232</sup> También se valuó la capacidad de 51 como inhibidor del factor 1 de ribosilación-ADP, un blanco terapéutico contra el cáncer, pero no fue bioactivo.<sup>169</sup> Desde el descubrimiento de **51** se han aislado varios ácidos tricodérmicos, los cuales comparten una base estructural de octahidronaftaleno y se diferencian por la posición de una insaturación y los sustituyentes en el biciclo.<sup>166,171,231,232</sup> Las moléculas 49 y 50 se han aislado de Trichoderma sp. cepa HN-1.1, T. virens, Trichoderma spirale y Penicillium ochrochloronthe; en cuanto a su actividad biológica in vitro, se ha evaluado su efecto contra líneas celulares de cáncer, bacterias de interés en medicina y hongos fitopatógenos, aunque fueron inactivos.<sup>166,171,231</sup> El policétido **53** fue aislado por primera vez en el año 2000 a partir del tejido de una esponja marina y años después del hongo *Cladosporium tenuissimum.*<sup>174,233</sup> Su síntesis y determinación estructural se aborda en varias publicaciones donde se han caracterizado espectroscópicamente sus diasteroisómeros.<sup>173,234-236</sup> A partir de ensayos in vitro se ha informado sobre su actividad inhibitoria contra una línea celular de adenocarcinoma alveolar, la inhibición de la enzima α-glucosidasa y se descartó que afectara el desarrollo de varias bacterias y hongos de interés en medicina.<sup>234-237</sup> El poliol insaturado 10 se describe por primera vez en este trabajo, no hay reportes de moléculas similares en el género *Clonostachys* y las más estructuralmente relacionadas son ciertos glicitoles y politerpenoides.<sup>193,238</sup> Los alcances de las investigaciones previas sobre los compuestos aislados reflejan que la evaluación de su efecto antibacteriano contra patógenos humanos multirresistentes es conveniente y revelan la posibilidad de aprovechar sus cepas correspondientes para otras investigaciones.

#### Bioactividad de los compuestos aislados

A partir de la evaluación de los compuestos aislados se determinó que **44**, **45** y **46** pueden inhibir el crecimiento de *A. baumannii* cepa A564 en más del 50% a una concentración de 100 μg/mL (**Cuadro 12**). Estos compuestos fueron aislados del extracto de los ascomicetos IQ-1129 e IQ-1038, el primero hallado en un nido de *S. geminata* y el segundo de sus alrededores. Para el resto de los morfotipos fraccionados queda abierta la posibilidad de continuar con su estudio químico basándose en la información presentada. Por otra parte, los compuestos inactivos (**47-53**) fueron candidatos para evaluar su efecto sobre la formación de la biopelícula de *A. baumannii*, sin embargo, a una concentración de 100 μg/mL ninguno inhibió su formación (**Anexo 58**).

66

Compuestos aislados por morfotipo	Inhibición en % (media ± desviación estándar)	Concentración (mM)
IQ-1129		
PF1140 ( <b>44</b> )	101.2 ± 1.7	0.36
Deoxi-PF1140 ( <b>45</b> )	99.9 ± 0.7	0.38
IQ-1038		
Ácido penicílico ( <b>46</b> )	67.8 ± 4.9	0.59
IQ-1017		
Brefeldina A ( <b>47</b> )	$9.9 \pm 3.4$	0.36
IQ-819		
Ácido tricodérmico ( <b>48</b> )	0	0.33
Ácido tricodérmico A ( <b>49</b> )	5.4 ± 3.9	0.31
Ácido tricodérmico C ( <b>50</b> )	0	0.31
Tricodermamida A ( <b>51</b> )	0	0.23
IQ-814		
( <i>E</i> )-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol ( <b>52</b> )	0	0.44
IQ-807		
<i>iso</i> -Cladospolida B ( <b>53</b> )	6.7 ± 5.0	0.44
*Colistina en agua a 20 µg/ mL	99.5 ± 0.8	0.02
*Gentamicina en agua a 64 µg/ mL	30.0 ± 4.1	0.11
Control negativo	0	-
Control de esterilidad	99.9 ± 0.1	-

Cuadro 12. Inhibición del crecimiento de A. baumannii cepa A564

Determinaciones realizadas al menos por quintuplicado, se reporta la media y su desviación estándar. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se evaluaron a una concentración final de 100 µg/mL. \*Controles positivos. Modificado de Aguilar-Colorado, Morales-Jiménez y Rivera-Chávez (2025).<sup>193</sup>

Debido a su naturaleza tóxica para el ser humano no se profundizó en la bioactividad de **46**, misma razón que sumada a su sobresaliente presencia en el extracto nos hace desaconsejar la continuación del estudio químico de IQ-1038. Por otro lado, la bioactividad de los constituyentes de IQ-1129 fue tratada más a fondo. Se determinó que la CMI de **44** y **45** es < 50 µg/mL, sin embargo, a partir de su curva concentración-respuesta se estimó en aproximadamente 11.0 y 31.6 µg/mL, equivalente a 39.6 y 120.8 µM, respectivamente (**Figura 36A**); a una concentración de 10 µg/mL, el porcentaje de inhibición (media ± desviación estándar) de **44** (66.2 ± 3.7%) presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con **45** (7.5 ± 5.1%; prueba de t de Student, p < 0.05). Además, ya que la CMB de ambos compuestos fue >200 µg/mL se infirió un efecto bacteriostático a las concentraciones inhibitorias del crecimiento. Asimismo, se determinó que ambos compuestos inhiben la formación de biopelícula en cerca del 20% y el 40% a 0.36 y 0.38 µM, de forma respectiva para **44** y **45** (**Figura 36B**). Dados los resultados puede considerarse que **44** es más potente que **45**. Al respecto, proponemos que el par de electrones solitarios del oxígeno en el grupo hidroxilo de **44** juega un papel favorecedor en el mecanismo de acción que compartirían ambos compuestos, por ejemplo, mediante la formación de puentes de hidrogeno o más probablemente de complejos con metales. La quelación juega un papel en el efecto inhibitorio de varios antibacterianos y específicamente para **44**, se ha descrito que el mecanismo contra *M. genitalium* involucra la formación de radiales libres, que resultan de la reacción endógena del peróxido de hidrogeno con un complejo de **44** con hierro (Fe<sup>3+</sup>).<sup>203,239</sup> Además, el efecto citotóxico *in vitro* contra una línea celular de cáncer de pulmón por la cordypiridona C (**77**), una *N*-piridin-2-ona, transcurre en parte por la detención del ciclo celular debido a la quelación del hierro libre por **44**.<sup>240</sup>

Esta investigación es uno de los primeros reportes sobre el efecto de **44** y **45** contra una bacteria multirresistente, ya que previamente se reportó la inhibición de la cepa de referencia *A. baumanii* ATCC 15308 por **44** (CMI de 16.6 µg/mL).<sup>204</sup> Continuar con la búsqueda de más piridin-2-onas en IQ-1129 y determinar su toxicidad son perspectivas que se extienden hacia futuro y desde un punto de vista más amplio, recomendamos continuar con el estudio químico y biológico de esta familia de compuestos, ya sea como metabolitos fúngicos o derivados semisintéticos.



Curva de inhibición del crecimiento bacteriano (función de Gompertz; **A**) e inhibición de la formación de biopelícula (**B**) de *A. baumannii* por **44** y **45**. Determinaciones realizadas al menos por quintuplicado y triplicado para cada tipo de bioensayo, respectivamente; se reporta la media ± desviación estándar. En **A** el control positivo consistió en colistina disuelta en agua a 20 µg/mL, cuya inhibición fue del 99.6 ± 0.5%. En **B** el control positivo consistió en gentamicina disuelta en agua a una concentración final de 64 µg/mL. C+: control positivo. C-: control negativo. CE: control de esterilidad.

Figura 36. Actividad antibacteriana de los compuestos 44 y 45 contra A. baumannii

El mapeo de la actividad de compuestos realizado con NP Analyst facilitó la selección de algunos morfotipos para su estudio químico, sin embargo, con el fin de revelar su asertividad y sus limitaciones se contrastó el efecto estimado para las relaciones m/z de los compuestos aislados contra las determinaciones *in vitro*. Los puntajes de bioactividad para las relaciones m/z de 44 y 47 a 53 coinciden de forma general con el efecto observado, pero para las restantes se consideran falsos negativos (45 y 46). En este sentido, cabe mencionar algunas particularidades: el puntaje de bioactividad para el 0 y 100% del efecto predicho no se corresponden con el valor mínimo y máximo que puede tomar la variable biológica; un puntaje de agrupamiento cercano a cero puede indicar una distribución restringida de la relación *mlz* y no debe descartarse inmediatamente y los puntajes de una relación *m*/*z* se abaten cuando se repite en extractos cuya bioactividad difiere demasiado, incluso si es genuinamente bioactiva. Se ha informado que las predicciones pueden optimizarse con información adicional, que en este caso serían resultados de inhibición contra otras bacterias y por fracciones de los extractos, sin embargo, el presente estudio no pretendía perfeccionarlo.<sup>155</sup> Podemos recomendar el uso de la plataforma en los estudios de bioprospección siempre que se enfoquen en aprovechar los puntajes de bioactividad más altos, no se ignoren los puntajes de agrupamiento cercanos a cero y se disponga de información químico-biológica.

## CONCLUSIONES

Una colección de morfotipos fúngicos aislables de hormigueros hallados en el suelo del bosque de niebla mexicano se cribó por su actividad antibiótica in vitro contra dos bacterias patógenas multirresistentes Gram negativas. La inhibición del crecimiento de A. baumannii por los extractos de una porción representativa de la micobiota se seleccionó como el criterio biológico para conducir un estudio de bioprospección, en conjunto con el análisis de su diversidad química por análisis metabolómicos no dirigidos. Los análisis por redes moleculares y la identificación tentativa de ciertos metabolitos (54-68) amplían la información química disponible sobre la micobiota de las hormigas y sus nidos, mientras que los datos de bioactividad indican que el suelo de los bosques nubosos es un reservorio vigente de hongos productores de compuestos antibacterianos. El fraccionamiento de los extractos escalados de ciertos morfotipos de interés condujo al aislamiento de 10 compuestos (44-53), de uno de los cuales se hace mención por primera vez (52). La determinación de la bioactividad de compuestos 44 y 45, así como la evaluación contra bacterias multirresistentes por el resto de los compuestos es una contribución a la búsqueda de antibióticos para tratamientos humanos. Además, la caracterización del efecto inhibitorio de 44 y 45 delimitó su probable mecanismo de acción. Los resultados de esta investigación subrayan el potencial de la micobiota hallada en el suelo del bosque de niebla, así como el aprovechamiento del efecto diferenciador que un ser vivo como las hormigas hace sobre el microbioma original cuando se establece.

### PERSPECTIVAS

- Continuar con la bioprospección de compuestos antibacterianos preferentemente a partir de la micobiota de los hormigueros de *S. geminata*.
- Conducir el aislamiento de los compuestos responsables de la bioactividad de los hongos
  *Trichoderma* sp. cepa IQ-819, *Clonostachys* sp. cepa IQ-814 y *Cladosporium* sp. cepa
  IQ-807, con énfasis en sus componentes minoritarios.
- Determinar la especie de la cepa IQ-1129 dado su potencial biosintético de piridin-2-onas y profundizar en el aislamiento de esta familia de compuestos, tal vez mediante una estrategia OSMAC.
- Continuar con el estudio de la bioactividad y la toxicidad de las piridin-2-onas tricíclicas como posible base estructural para el desarrollo de tratamientos antibacterianos.

# REFERENCIAS

- (1) Carocho, M.; Heleno, S. A.; Barros, L. *Natural secondary metabolites: from nature, through science, to industry*; Springer International Publishing: Cham, Suiza, **2023**.
- (2) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr* **2017**, *5* (4), 79–95. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- (3) Schueffler, A.; Anke, T. Fungal natural products in research and development. *Nat Prod Rep* **2014**, *31* (10), 1425–1448. https://doi.org/10.1039/c4np00060a.
- (4) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* **2020**, *83* (3), 770–803. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- (5) Moloney, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends Pharmacol Sci* **2016**, *37*(8), 689–701. https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.001.
- (6) Wright, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat Prod Rep* **2017**, *34*(7), 694–701. https://doi.org/10.1039/C7NP00019G.
- (7) Qi, L.-W.; Liu, E.-H.; Chu, C.; Peng, Y.-B.; Cai, H.-X.; Li, P. Anti-diabetic agents from natural products—an update from 2004 to 2009. *Curr Top Med Chem* **2010**, *10* (4), 434–457. https://doi.org/10.2174/156802610790980620.
- (8) Fukuda, T. T. H.; Helfrich, E. J. N.; Mevers, E.; Melo, W. G. P.; van Arnam, E. B.; Andes, D. R.; Currie, C. R.; Pupo, M. T.; Clardy, J. Specialized metabolites reveal evolutionary history and geographic dispersion of a multilateral symbiosis. ACS Cent Sci 2021, 7 (2), 292–299. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00978.
- (9) Aguilar-Colorado, Á. S.; Rivera-Chávez, J. Ants/nest-associated fungi and their specialized metabolites: taxonomy, chemistry, and bioactivity. *Rev Bras Farmacogn* **2023**, *33*(5), 901–923. https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3.
- (10) Toledo-Aceves, T.; Meave, J. A.; González-Espinosa, M.; Ramírez-Marcial, N. Tropical montane cloud forests: Current threats and opportunities for their conservation and sustainable management in Mexico. *J Environ Manage* 2011, *92* (3), 974–981. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.007.
- Karger, D. N.; Kessler, M.; Lehnert, M.; Jetz, W. Limited protection and ongoing loss of tropical cloud forest biodiversity and ecosystems worldwide. *Nat Ecol Evol* 2021, *5* (6), 854–862. https://doi.org/10.1038/s41559-021-01450-y.
- (12) Ventola, C. Antibiotic resistance crisis. *Pharm Ther* **2015**, *40*(4), 277–283.
- (13) OMS; FAO; OMSA. *Marco estratégico de colaboración sobre la resistencia a los antimicrobianos*; OMS: Ginebra, Suiza, **2022**.
- (14) OMS. *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*; Ginebra, Suiza, **2016**.
- (15) Stekel, D. First report of antimicrobial resistance pre-dates penicillin. *Nature* **2018**, *562* (7726), 192–192. https://doi.org/10.1038/d41586-018-06983-0.
- (16) Magiorakos, A. P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G.; Harbarth, S.; Hindler, J. F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D. L.; Rice, L. B.; Stelling, J.; Struelens, M. J.; Vatopoulos, A.; Weber, J. T.; Monnet, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **2012**, *18* (3), 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- (17) Pancu, D. F.; Scurtu, A.; Macasoi, I. G.; Marti, D.; Mioc, M.; Soica, C.; Coricovac, D.; Horhat, D.; Poenaru, M.; Dehelean, C. Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds

with antibacterial activity-a pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics* **2021**, *10*(4), 1–35. https://doi.org/10.3390/antibiotics10040401.

- (18) Walesch, S.; Birkelbach, J.; Jézéquel, G.; Haeckl, F. P. J.; Hegemann, J. D.; Hesterkamp, T.; Hirsch, A. K. H.; Hammann, P.; Müller, R. Fighting antibiotic resistance—strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials. *EMBO Rep* **2023**, *24* (1), 1–33. https://doi.org/10.15252/embr.202256033.
- (19) Acar, J. Broad- and narrow-spectrum antibiotics: an unhelpful categorization. *Clin Microbiol Infect* **1997**, *3* (4), 395–396. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00274.x.
- (20) Zhgun, A. A. Industrial production of antibiotics in fungi: current state, deciphering the molecular basis of classical strain improvement and increasing the production of highyielding strains by the addition of low-molecular weight inducers. *Fermentation* 2023, 9 (12), 1–38. https://doi.org/10.3390/fermentation9121027.
- Muteeb, G.; Rehman, M. T.; Shahwan, M.; Aatif, M. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: a narrative review. *Pharmaceuticals* 2023, *16*(11), 1–54. https://doi.org/10.3390/ph16111615.
- (22) Silver, L. L. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* **2011**, *24*(1), 71–109. https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10.
- (23) FAO; PNUMA; OMS; OMSA. *"Una sola salud" Plan de acción conjunto (2022-2026)*; Roma, Italia, **2023**.
- (24) Institute for Health Metrics and Evaluation; University of Oxford. *MICROBE: Measuring Infectious Causes and Resistance Outcomes for Burden Estimation.* https://vizhub.healthdata.org/microbe/ (consultado el 2024-10-30).
- (25) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carvalheiro, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Khorana, M.; Kissoon, N.; Kobeissi, E.; Kostyanev, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Mussi-Pinhata, M. M.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Olivas-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thaiprakong, A.; Thwaites, G.; Turner, C.; Turner, P.; van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vu, H.; Walsh, T.; Waner, S.; Wangrangsimakul, T.; Wozniak, T.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet 2022, 399 (10325), 629-655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

- (26) O'Neill, J. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendatios*; Government of the United Kingdom: Reino Unido, **2016**.
- Mora, C.; McKenzie, T.; Gaw, I. M.; Dean, J. M.; von Hammerstein, H.; Knudson, T. A.; Setter, R. O.; Smith, C. Z.; Webster, K. M.; Patz, J. A.; Franklin, E. C. Over half of known human pathogenic diseases can be aggravated by climate change. *Nat Clim Chang* 2022, *12* (9), 869–875. https://doi.org/10.1038/s41558-022-01426-1.
- (28) Walsh, T. R.; Gales, A. C.; Laxminarayan, R.; Dodd, P. C. Antimicrobial resistance: addressing a global threat to humanity. *PLoS Med* **2023**, *20* (7), 1–4. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004264.
- (29) WHO. *WHO Bacterial priority pathogens list, 2024*; WHO: Ginebra, Suiza, **2024**.
- (30) De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020, *33*(3), 1–49. https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19.
- (31) Secretaría de Gobernación. Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. *Diario Oficial de la Federación*. México June 5, 2018.
- (32) Hautbergue, T.; Jamin, E. L.; Debrauwer, L.; Puel, O.; Oswald, I. P. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Nat Prod Rep* **2018**, *35*(2), 147–173. https://doi.org/10.1039/C7NP00032D.
- (33) Wetzel, C.; Lonneman, M.; Wu, C. Polypharmacological drug actions of recently FDA approved antibiotics. *Eur J Med Chem* **2021**, *209*, 112931. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112931.
- (34) Madden, J.; Outterson, K. Trends in the global antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* **2023**, *22*(3), 174–174. https://doi.org/10.1038/d41573-023-00029-5.
- (35) Amabile-Cuevas, C. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2010**, *4* (03), 126–131. https://doi.org/10.3855/jidc.427.
- Morfin-Otero, R.; Noriega, E. R.; Dowzicky, M. J. Antimicrobial susceptibility trends among Gram-positive and -negative clinical isolates collected between 2005 and 2012 in Mexico: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015, *14*(53), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12941-015-0116-y.
- Garza-González, E.; Franco-Cendejas, R.; Morfín-Otero, R.; Echaniz-Aviles, G.; Rojas-(37) Larios, F.; Bocanegra-Ibarias, P.; Flores-Treviño, S.; Ponce-De-León, A.; Rodríguez-Noriega, E.; Alavez-Ramírez, N.; Mena-Ramirez, J. P.; Rincón-Zuno, J.; Fong-Camargo, M. G.; Morales-De-La-Peña, C. T.; Huerta-Baltazar, C. R.; López-Jacome, L. E.; Carnalla-Barajas, M. N.; Soto-Noguerón, A.; Sanchez-Francia, D.; Moncada-Barrón, D.; Ortíz-Brizuela, E.; García-Mendoza, L.; Newton-Sánchez, O. A.; Choy-Chang, E. V.; Aviles-Benitez, L. K.; Martínez-Miranda, R.; Feliciano-Guzmán, J. M.; Peña-Lopez, C. D.; Couoh-May, C. A.; López-Gutiérrez, E.; Gil-Veloz, M.; Armenta-Rodríguez, L. C.; Manriquez-Reyes, M.; Gutierrez-Brito, M.; López-Ovilla, I.; Adame-Álvarez, C.; Barajas-Magallón, J. M.; Aguirre-Burciaga, E.; Coronado-Ramírez, A. M.; Rosales-García, A. A.; Sida-Rodríguez, S.; Urbina-Rodríguez, R. E.; López-Moreno, L. I.; Juárez-Velázquez, G. E.; Martínez-Villarreal, R. T.; Canizales-Oviedo, J. L.; Cetina-Umaña, C. M.; Perez-Juárez, M. M.; González-Moreno, A.; Romero-Romero, D.; Bello-Pazos, F. D.; Aguilar-Orozco, G.; Barlandas-Rendón, N. R. E.; Maldonado-Anicacio, J. Y.; Valadez-Quiroz, A.; Camacho-Ortiz, A. The evolution of antimicrobial resistance in Mexico during the last decade: results from the INVIFAR group. Microb Drug Resist 2020, 26 (11), 1372–1382. https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0354.

- Garza-González, E.; Morfín-Otero, R.; Mendoza-Olazarán, S.; Bocanegra-Ibarias, P.; (38) Flores-Treviño, S.; Rodríguez-Noriega, E.; Ponce-de-León, A.; Sanchez-Francia, D.; Franco-Cendejas, R.; Arroyo-Escalante, S.; Velázquez-Acosta, C.; Rojas-Larios, F.; Quintanilla, L. J.; Maldonado-Anicacio, J. Y.; Martínez-Miranda, R.; Ostos-Cantú, H. L.; Gomez-Choel, A.; Jaime-Sanchez, J. L.; Avilés-Benítez, L. K.; Feliciano-Guzmán, J. M.; Peña-López, C. D.; Couoh-May, C. A.; Molina-Jaimes, A.; Vázquez -Narvaez, E. G.; Rincón-Zuno, J.; Rivera-Garay, R.; Galindo-Espinoza, A.; Martínez-Ramirez, A.; Mora, J. P.; Corte- Rojas, R. E.; López-Ovilla, I.; Monroy-Colin, V. A.; Barajas-Magallón, J. M.; Morales-De-la-Peña, C. T.; Aguirre-Burciaga, E.; Coronado-Ramírez, M.; Rosales-García, A. A.; Ayala-Tarín, M. de J.; Sida-Rodríguez, S.; Pérez-Vega, B. A.; Navarro-Rodríguez, A.; Juárez-Velázquez, G. E.; Cetina-Umaña, C. M.; Mena-Ramírez, J. P.; Canizales-Oviedo, J.; Moreno-Méndez, M. I.; Romero-Romero, D.; Arévalo-Mejía, A.; Cobos-Canul, D. I.; Aguilar-Orozco, G.; Silva-Sánchez, J.; Camacho-Ortiz, A. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. PLoS One 2019, 14 (3), 1-13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865.
- (39) Berndtson, A. E.; Bricker-Ford, R.; Box, K.; Madsen, G. Z.; Malany, L.; Smith, A. M.; Costantini, T. W.; Coimbra, R. Cross-border antibiotic resistance patterns in trauma patients. *Surgery* 2019, *166*(1), 109–115. https://doi.org/10.1016/j.surg.2019.03.023.
- (40) Camacho-Silvas, L. A.; Portillo-Gallo, J. H.; Rivera-Cisneros, A. E.; Sánchez-González, J. M.; Franco-Cendejas, R.; Duque-Rodríguez, J.; Velo-Méndez, G.; Ishida-Gutiérrez, C. Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cir Cir* 2021, *89*(4), 426–434. https://doi.org/10.24875/CIRU.20000304.
- (41) Ortíz-Gil, M. Á.; Velazquez-Meza, M. E.; Echániz-Aviles, G.; Mora-Domínguez, J. P.; Carnalla-Barajas, M. N.; Mendiola del Moral, E. L. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a hospital in Southern Mexico. *Salud Publ Mex* 2020, *62* (2), 186. https://doi.org/10.21149/10786.
- (42) Catalán-Nájera, J. C.; Barrios-Camacho, H.; Duran-Bedolla, J.; Sagal-Prado, A.; Hernández-Castro, R.; García-Méndez, J.; Morfín-OteroMorfín-Otero, R.; Velázquez-Larios, M. del R.; Ortíz-Navarrete, V.; Gutierrez-Xicotencatl, L.; Alpuche-Aranda, C.; Silva-Sánchez, J.; Garza-Ramos, U. Molecular characterization and pathogenicity determination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates serotype K2 in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2019**, *94* (3), 316–319. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.013.
- (43) Alcántar-Curiel, M. D.; Rosales-Reyes, R.; Jarillo-Quijada, M. D.; Gayosso-Vázquez, C.; Fernández-Vázquez, J. L.; Toledano-Tableros, J. E.; Giono-Cerezo, S.; Garza-Villafuerte, P.; López-Huerta, A.; Vences-Vences, D.; Morfín-Otero, R.; Rodríguez-Noriega, E.; López-Álvarez, M. del R.; Espinosa-Sotero, M. del C.; Santos-Preciado, J. I. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in three tertiary care hospitals in Mexico: virulence profiles, innate immune response and clonal dissemination. *Front Microbiol* **2019**, *10* (2116), 1–19. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02116.
- (44) UNAM. *Reporte de los hospitales de la red PUCRA: resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos*; Ciudad de México, México, **2023**.
- (45) Rojas-Larios, F.; Martínez-Guerra, B. A.; López-Jácome, L. E.; Bolado-Martínez, E.; Vázquez-Larios, M. del R.; Velázquez-Acosta, M. del C.; Romero-Romero, D.; Mireles-Dávalos, C. D.; Quintana-Ponce, S.; Feliciano-Guzmán, J. M.; Pérez-Hernandez, J. M.; Correa-León, Y. P.; López-Gutiérrez, E.; Rodriguez-Noriega, E.; González-Díaz, E.; Choy-Chang, E. V.; Mena-Ramírez, J. P.; Monroy-Colín, V. A.; Ponce-de-León-Garduño, A.; Alcaraz-Espejel, M.; Avilés-Benítez, L. K.; Quintanilla-Cazares, L. J.; Ramírez-Alanís, E.;

Barajas-Magallón, J. M.; Padilla-Ibarra, C.; Ballesteros-Silva, M. B.; Atanacio-Sixto, N. A.; Morales-de-la-Peña, C. T.; Galindo-Méndez, M.; Pérez-Vicelis, T.; Jacobo-Baca, G.; Moreno-Méndez, M. I.; Mora-Pacheco, M. de la L.; Gutiérrez-Brito, M.; Sánchez-Godínez, X. Y.; Navarro-Vargas, N. V.; Mercado-Bravo, L. E.; Delgado-Barrientos, A.; Santiago-Calderón, M. A.; López-Ovilla, I.; Molina-Chavarria, A.; Rincón-Zuno, J.; Franco-Cendejas, R.; Miranda-Mauricio, S.; Márquez-Avalos, I. C.; López-García, M.; Duarte-Miranda, L. S.; Cetina-Umaña, C. M.; Barroso-Herrera-y-Cairo, I. E.; López-Moreno, L. I.; Garza-González, E. Active surveillance of antimicrobial resistance and carbapenemase-encoding genes according to sites of care and age groups in Mexico: results from the INVIFAR network. *Pathogens* **2023**, *12*(9), 1–15. https://doi.org/10.3390/pathogens12091144.

- (46) Amabile-Cuevas, C. F. Antibiotic usage and resistance in Mexico: an update after a decade of change. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2021**, *15* (04), 442–449. https://doi.org/10.3855/jidc.13467.
- (47) Zumaya-Estrada, F. A.; Ponce-De-león-garduño, A.; Ortiz-Brizuela, E.; Tinoco-Favila, J. C.; Cornejo-Juárez, P.; Vilar-Compte, D.; Sassoé-González, A.; Saturno-Hernandez, P. J.; Alpuche-Aranda, C. M. Point prevalence survey of antimicrobial use in four tertiary care hospitals in Mexico. *Infect Drug Resist* 2021, 14, 4553–4566. https://doi.org/10.2147/IDR.S327721.
- (48) Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*; John Wiley and Sons: Chichester, Reino Unido, **2009**.
- (49) Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*(12), 4022–4034. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046.
- (50) Cantrell, C. L.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod* **2012**, *75*(6), 1231–1242. https://doi.org/10.1021/np300024u.
- (51) Saldívar-González, F. I.; Pilón-Jiménez, B. A.; Medina-Franco, J. L. Chemical space of naturally occurring compounds. *Phys Sci Rev* **2019**, *4* (5), 1–14. https://doi.org/10.1515/psr-2018-0103.
- (52) Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Orhan, I. E.; Banach, M.; Rollinger, J. M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E. A.; Majeed, M.; Bishayee, A.; Bochkov, V.; Bonn, G. K.; Braidy, N.; Bucar, F.; Cifuentes, A.; D'Onofrio, G.; Bodkin, M.; Diederich, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Efferth, T.; El Bairi, K.; Arkells, N.; Fan, T.-P.; Fiebich, B. L.; Freissmuth, M.; Georgiev, M. I.; Gibbons, S.; Godfrey, K. M.; Gruber, C. W.; Heer, J.; Huber, L. A.; Ibanez, E.; Kijjoa, A.; Kiss, A. K.; Lu, A.; Macias, F. A.; Miller, M. J. S.; Mocan, A.; Müller, R.; Nicoletti, F.; Perry, G.; Pittalà, V.; Rastrelli, L.; Ristow, M.; Russo, G. L.; Silva, A. S.; Schuster, D.; Sheridan, H.; Skalicka-Woźniak, K.; Skaltsounis, L.; Sobarzo-Sánchez, E.; Bredt, D. S.; Stuppner, H.; Sureda, A.; Tzvetkov, N. T.; Vacca, R. A.; Aggarwal, B. B.; Battino, M.; Giampieri, F.; Wink, M.; Wolfender, J.-L.; Xiao, J.; Yeung, A. W. K.; Lizard, G.; Popp, M. A.; Heinrich, M.; Berindan-Neagoe, I.; Stadler, M.; Daglia, M.; Verpoorte, R.; Supuran, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2021, *20*(3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z.
- (53) Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* **2005**, *58* (1), 1–26. https://doi.org/10.1038/ja.2005.1.
- (54) Ntie-Kang, F.; Svozil, D. An enumeration of natural products from microbial, marine and terrestrial sources. *Phys Sci Rev* **2020**, *5*(8), 1–22. https://doi.org/10.1515/psr-2018-0121.
- (55) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **2019**, *51*, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008.
- (56) Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17*(3), 167–180. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1.

- (57) Correia, J.; Borges, A.; Simões, M.; Simões, L. Beyond penicillin: the potential of filamentous fungi for drug discovery in the age of antibiotic resistance. *Antibiotics* 2023, *12* (8), 1–21. https://doi.org/10.3390/antibiotics12081250.
- (58) Shi, Y.; Ji, M.; Dong, J.; Shi, D.; Wang, Y.; Liu, L.; Feng, S.; Liu, L. New bioactive secondary metabolites from fungi: 2023. *Mycology* 2024, 15 (3), 283–321. https://doi.org/10.1080/21501203.2024.2354302.
- (59) Newman, D. J. Natural products and drug discovery. *Natl Sci Rev* **2022**, *9* (11), 1–21. https://doi.org/10.1093/nsr/nwac206.
- (60) Spížek, J.; Sigler, K.; Řezanka, T.; Demain, A. Biogenesis of antibiotics—viewing its history and glimpses of the future. *Folia Microbiol (Praha)* **2016**, *61* (4), 347–358. https://doi.org/10.1007/s12223-016-0462-y.
- (61) Traxler, M. F.; Kolter, R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat Prod Rep* **2015**, *32*(7), 956–970. https://doi.org/10.1039/c5np00013k.
- (62) González-Medina, M.; Owen, J. R.; El-Elimat, T.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H.; Figueroa, M.; Medina-Franco, J. L. Scaffold diversity of fungal metabolites. *Front Pharmacol* 2017, *8* (180), 1–12. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00180.
- (63) González-Medina, M.; Prieto-Martínez, F. D.; Naveja, J. J.; Méndez-Lucio, O.; El-Elimat, T.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H.; Figueroa, M.; Medina-Franco, J. L. Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. *Future Med Chem* 2016, *8*(12), 1399– 1412. https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0079.
- (64) Sułkowska-Ziaja, K.; Trepa, M.; Olechowska-Jarząb, A.; Nowak, P.; Ziaja, M.; Kała, K.; Muszyńska, B. Natural compounds of fungal origin with antimicrobial activity—potential cosmetics applications. *Pharmaceuticals* 2023, *16* (9), 1–32. https://doi.org/10.3390/ph16091200.
- (65) Villanueva-Silva, R.; Velez, P.; Riquelme, M.; Fajardo-Hernández, C. A.; Martínez-Cárdenas, A.; Arista-Romero, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Franzblau, S. G.; Figueroa, M. Chemical diversity and antimicrobial potential of cultivable fungi from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules* 2021, 26 (23), 1–16. https://doi.org/10.3390/molecules26237328.
- (66) Fajardo-Hernández, C. A.; Khan, F. S. T.; Flores-Bocanegra, L.; Prieto-Davó, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Villanueva-Silva, R.; Martínez-Cárdenas, A.; López-Lobato, M. A.; Hematian, S.; Franzblau, S. G.; Raja, H. A.; García-Contreras, R.; Figueroa, M. Insights into the chemical diversity of selected fungi from the Tza Itzá cenote of the Yucatan peninsula. *ACS Omega* 2022, 7(14), 12171–12185. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00544.
- (67) Martínez-Aldino, I. Y.; Rivera-Chávez, J.; Morales-Jiménez, J. Integrating taxonomic and chemical diversity of mangrove-associated ascomycetes to discover or repurpose bioactive natural products. *J Nat Prod* **2023**, *86* (11), 2423–2434. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00490.
- (68) Carrillo-Jaimes, K.; Fajardo-Hernández, C. A.; Hernández-Sedano, F.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; Quiroz-García, B.; Rivera-Chávez, J. Antibacterial activity and AbFtsZ binding properties of fungal metabolites isolated from Mexican mangroves. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2024, *34*(3), 564–576. https://doi.org/10.1007/s43450-023-00507-2.
- (69) Elmaidomy, A. H.; Shady, N. H.; Abdeljawad, K. M.; Elzamkan, M. B.; Helmy, H. H.; Tarshan, E. A.; Adly, A. N.; Hussien, Y. H.; Sayed, N. G.; Zayed, A.; Abdelmohsen, U. R. Antimicrobial potentials of natural products against multidrug resistance pathogens: a comprehensive review. *RSC Adv* 2022, *12* (45), 29078–29102. https://doi.org/10.1039/D2RA04884A.

- (70) Silber, J.; Kramer, A.; Labes, A.; Tasdemir, D. From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Mar Drugs* **2016**, *14* (7), 137. https://doi.org/10.3390/md14070137.
- (71) Wang, P.; Huang, X.; Jiang, C.; Yang, R.; Wu, J.; Liu, Y.; Feng, S.; Wang, T. Antibacterial properties of natural products from marine fungi reported between 2012 and 2023: a review. *Arch Pharm Res* 2024, *47*(6), 505–537. https://doi.org/10.1007/s12272-024-01500-6.
- Wei, Y.; Li, H. Editorial: Exploring the insect microbiome: the potential future role in biotechnology industry. *Front Microbiol* 2022, *13* (19), R868–R872. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1061360.
- (73) Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C. C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G. H.; Kazou, M.; Kinkel, L.; Lange, L.; Lima, N.; Loy, A.; Macklin, J. A.; Maguin, E.; Mauchline, T.; McClure, R.; Mitter, B.; Ryan, M.; Sarand, I.; Smidt, H.; Schelkle, B.; Roume, H.; Kiran, G. S.; Selvin, J.; Souza, R. S. C. de; van Overbeek, L.; Singh, B. K.; Wagner, M.; Walsh, A.; Sessitsch, A.; Schloter, M. Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020, *8* (103), 1–22. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0.
- (74) Wiens, J. J. How many species are there on Earth? Progress and problems. *PLoS Biol* **2023**, *21* (11), e3002388. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002388.
- (75) Joly, D.; Faure, D. Next-generation sequencing propels environmental genomics to the front line of research. *Heredity (Edinb)* **2015**, *114* (5), 429–430. https://doi.org/10.1038/hdy.2015.23.
- (76) Wiens, J. J. Vast (but avoidable) underestimation of global biodiversity. *PLoS Biol* 2021, *19*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001192.
- (77) Larsen, B. B.; Miller, E. C.; Rhodes, M. K.; Wiens, J. J. Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on Earth and the new pie of Life. *Q Rev Biol* 2017, *92* (3), 229–265. https://doi.org/10.1086/693564.
- (78) Eisenhauer, N.; Hines, J. Invertebrate biodiversity and conservation. *Current Biology* **2021**, *31* (19), R1214–R1218. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.058.
- (79) Sollai, G.; Giglio, A.; Giulianini, P. G.; Crnjar, R.; Solari, P. Topic: arthropod biodiversity: ecological and functional aspects. *Insects* **2024**, *15* (10), 766. https://doi.org/10.3390/insects15100766.
- (80) Bánki, O.; Roskov, Y.; Döring, M.; Ower, G.; Hernández Robles, D. R.; Plata Corredor, C. A.; Stjernegaard Jeppesen, T.; Örn, A.; Vandepitte, L.; Pape, T.; Hobern, D.; Garnett, S.; Little, H.; DeWalt, R. E.; Ma, K.; Miller, J.; Orrell, T.; Aalbu, R.; Abbott, J. *Catalogue of life*. https://www.catalogueoflife.org/ (consultado el 2024-11-02).
- (81) Stork, N. E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annu Rev Entomol* 2018, *63* (1), 31–45. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348.
- (82) Bignell, D. E.; Anderson, J. M.; Chosse, R. Isolation of facultatively aerobic actinomycetes from the gut, parent soil and mound materials of the termites *Procubitermes aburiensis* and *Cubitermes severus*. *FEMS Microbiol Lett* **1991**, *85* (2), 151–160. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04707.x-i1.
- (83) Yan, S.; Li, S.; Wu, W.; Zhao, F.; Bao, L.; Ding, R.; Gao, H.; Wen, H.-A.; Song, F.; Liu, H.-W. Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests. *Chem Biodivers* **2011**, *8*(9), 1689–1700. https://doi.org/10.1002/cbdv.201100026.

- (84) Chen, S.; Cheng, D.; Liu, Z.; Hassan, B.; Xu, Y. Community structure and antifungal activity of actinobacteria in a fungus-growing termite. *Ecol Entomol* **2023**, *48* (2), 251–262. https://doi.org/10.1111/een.13219.
- (85) Poulsen, M.; Oh, D. C.; Clardy, J.; Currie, C. R. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS One* **2011**, *6*(2), e16763. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016763.
- (86) Madden, A. A.; Grassetti, A.; Soriano, J. A. N.; Starks, P. T. Actinomycetes with antimicrobial activity isolated from paper wasp (*Hymenoptera: Vespidae: Polistinae*) nests. *Environ Entomol* **2013**, *42*(4), 703–710. https://doi.org/10.1603/EN12159.
- (87) Promnuan, Y.; Promsai, S.; Pathom-Aree, W.; Meelai, S. *Apis andreniformis* associated actinomycetes show antimicrobial activity against black rot pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. campestris). *PeerJ***2021**, *9*, e12097. https://doi.org/10.7717/peerj.12097.
- (88) Iwai, K.; Iwamoto, S.; Aisaka, K.; Suzuki, M. Isolation of novel actinomycetes from spider materials. *Actinomycetologica* **2009**, *23*(1), 8–15. https://doi.org/10.3209/saj.SAJ230103.
- (89) Lange, C.; Boyer, S.; Bezemer, T. M.; Lefort, M. C.; Dhami, M. K.; Biggs, E.; Groenteman, R.; Fowler, S. V.; Paynter, Q.; Verdecia Mogena, A. M.; Kaltenpoth, M. Impact of intraspecific variation in insect microbiomes on host phenotype and evolution. *ISME Journal* 2023, *17* (11), 1798–1807. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01500-2.
- (90) Litwin, A.; Nowak, M.; Różalska, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2020, *19* (1), 23–42. https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1.
- (91) Grundmann, C. O.; Guzman, J.; Vilcinskas, A.; Pupo, M. T. The insect microbiome is a vast source of bioactive small molecules. *Nat Prod Rep* **2024**, *41* (6), 935–967. https://doi.org/10.1039/D3NP00054K.
- (92) Kett, S.; Pathak, A.; Turillazzi, S.; Cavalieri, D.; Marvasi, M. Antifungals, arthropods and antifungal resistance prevention: lessons from ecological interactions. *Proc R Soc B* **2021**, *288* (1944), 20202716. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2716.
- (93) Huerta-García, A.; Álvarez-Cervantes, J. The gut microbiota of insects: a potential source of bacteria and metabolites. *Int J Trop Insect Sci* **2024**, *44* (1), 13–30. https://doi.org/10.1007/s42690-023-01147-8.
- (94) Dáttilo, W.; Vásquez-Bolaños, M.; Ahuatzin, D. A.; Antoniazzi, R.; Chávez-González, E.; Corro, E.; Luna, P.; Guevara, R.; Villalobos, F.; Madrigal-Chavero, R.; Falcão, J. C. de F.; Bonilla-Ramírez, A.; Romero, A. R. G.; de la Mora, A.; Ramírez-Hernández, A.; Escalante-Jiménez, A. L.; Martínez-Falcón, A. P.; Villarreal, A. I.; Sandoval, A. G. C.; Aponte, B.; Juárez-Juárez, B.; Castillo-Guevara, C.; Moreno, C. E.; Albor, C.; Martínez-Tlapa, D. L.; Huber-Sannwald, E.; Escobar, F.; Montiel-Reyes, F. J.; Varela-Hernández, F.; Castaño-Meneses, G.; Pérez-Lachaud, G.; Pérez-Toledo, G. R.; Alcalá-Martínez, I.; Rivera-Salinas, I. S.; Chairez-Hernández, I.; Chamorro-Florescano, I. A.; Hernández-Flores, J.; Toledo, J. M.; Lachaud, J. P.; Reyes-Muñoz, J. L.; Valenzuela-González, J. E.; Horta-Vega, J. V.; Cruz-Labana, J. D.; Reynoso-Campos, J. J.; Navarrete-Heredia, J. L.; Rodríguez-Garza, J. A.; Pérez-Domínguez, J. F.; Benítez-Malvido, J.; Ennis, K. K.; Sáenz, L.; Díaz-Montiel, L. A.; Tarango-Arámbula, L. A.; Quiroz-Robedo, L. N.; Rosas-Mejía, M.; Villalvazo-Palacios, M.; Gómez-Lazaga, M.; Cuautle, M.; Aguilar-Méndez, M. J.; Baena, M. L.; Madora-Astudillo, M.; Rocha-Ortega, M.; Pale, M.; García-Martínez, M. A.; Soto-Cárdenas, M. A.; Correa-Ramírez, M. M.; Janda, M.; Rojas, P.; Torres-Ricario, R.; Jones, R. W.; Coates, R.; Gómez-Acevedo, S. L.; Ugalde-Lezama, S.; Philpott, S. M.; Joaqui, T.; Marques, T.; Zamora-Gutierrez, V.; Martínez Mandujano, V.; Hajian-Forooshani, Z.; MacGregor-Fors, I. Mexico ants: incidence

and abundance along the Nearctic–Neotropical interface. *Ecology* **2020**, *101* (4), 16–21. https://doi.org/10.1002/ecy.2944.

- (95) Rojas Fernández, P. Las hormigas del suelo en México: Diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool Mex 2001, No. Es1, 189–238. https://doi.org/10.21829/azm.2001.8401851.
- (96) Agarwal, S.; Sharma, G.; Verma, K.; Latha, N.; Mathur, V. Pharmacological potential of ants and their symbionts–a review. *Entomol Exp Appl* **2022**, *170* (12), 1032–1048. https://doi.org/10.1111/eea.13236.
- (97) Dejean, A.; Azémar, F.; Naskrecki, P.; Tindo, M.; Rossi, V.; Faucher, C.; Gryta, H. Mutualistic interactions between ants and fungi: A review. *Ecol Evol* **2023**, *13* (8), e10386. https://doi.org/10.1002/ece3.10386.
- (98) Batey, S. F. D.; Greco, C.; Hutchings, M. I.; Wilkinson, B. Chemical warfare between fungusgrowing ants and their pathogens. *Curr Opin Chem Biol* **2020**, *59*, 172–181. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.001.
- (99) Hansen, K. A.; Kim, R. R.; Lawton, E. S.; Tran, J.; Lewis, S. K.; Deol, A. S.; Van Arnam, E. B. Bacterial associates of a desert specialist fungus-growing ant antagonize competitors with a nocamycin analog. *ACS Chem Biol* **2022**, *17* (7), 1824–1830. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00187.
- (100) Chang, P. T.; Rao, K.; Longo, L. O.; Lawton, E. S.; Scherer, G.; Van Arnam, E. B. Thiopeptide defense by an ant's bacterial symbiont. *J Nat Prod* 2020, *83* (3), 725–729. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00897.
- (101) Ortega, H. E.; Batista, J. M.; Melo, W. G. P.; Clardy, J.; Pupo, M. T. Absolute configurations of griseorhodins A and C. *Tetrahedron Lett* **2017**, *58* (50), 4721–4723. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.11.008.
- (102) Kim, J. H.; Scherer, G.; Lumpkin, D. S.; Rao, K.; Puentes Flores, C. D.; Van Arnam, E. B. *Amycolatopsis* from desert specialist fungus-growing ants suppresses contaminant fungi Using the antibiotic ECO-0501. *Appl Environ Microbiol* 2023, *89* (2), 1–9. https://doi.org/10.1128/aem.01838-22.
- (103) Kronauer, D. J. Recent advances in army ant biology (*Hymenoptera: Formicidae*). *Myrmecol. News.* **2009**, *12*, 51–65.
- (104) Reese, C.; Graber, L. C.; Ramalho, M. O.; Moreau, C. S. The diversity of *Wolbachia* across the turtle ants (*Formicidae: Cephalotes* spp.). *Biology (Basel)* **2024**, *13* (2), 121. https://doi.org/10.3390/biology13020121.
- (105) Schröder, D.; Deppisch, H.; Obermayer, M.; Krohne, G.; Stackebrandt, E.; Hölldobler, B.; Goebel, W.; Gross, R. Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol Microbiol* **1996**, *21* (3), 479–489. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02557.x.
- (106) Quan, Y.; da Silva, N. M.; de Souza Lima, B. J. F.; de Hoog, S.; Vicente, V. A.; Mayer, V.; Kang, Y.; Shi, D. Black fungi and ants: a genomic comparison of species inhabiting carton nests versus domatia. *IMA Fungus* 2022, *13*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s43008-022-00091-5.
- (107) Mayer, V. E.; Voglmayr, H.; Blatrix, R.; Orivel, J.; Leroy, C. Fungi as mutualistic partners in ant-plant interactions. *Front Fungal Biol* **2023**, *4*, 1213997. https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1213997.
- (108) Solomon, S. E.; Rabeling, C.; Sosa-Calvo, J.; Lopes, C. T.; Rodrigues, A.; Vasconcelos, H. L.; Bacci, M.; Mueller, U. G.; Schultz, T. R. The molecular phylogenetics of *Trachymyrmex* Forel ants and their fungal cultivars provide insights into the origin and coevolutionary history of 'higher-attine' ant agriculture. *Syst Entomol* 2019, *44* (4), 939–956. https://doi.org/10.1111/syen.12370.

- (109) Sosa-Calvo, J.; Jesovnik, A.; Okonski, E.; Schultz, T. R. Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (*Hymenoptera: Myrmicinae: Attini*). *Sociobiology* 2015, *62* (2), 300–320. https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i2.300-320.
- (110) Bizarria, R.; de Castro Pietrobon, T.; Rodrigues, A. Uncovering the yeast communities in fungus-growing ant colonies. *Microb Ecol* **2023**, *86* (1), 624–635. https://doi.org/10.1007/s00248-022-02099-1.
- (111) Angelone, S.; Bidochka, M. J. Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. *J Invertebr Pathol* **2018**, *156*, 73–76. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.009.
- (112) Melo, W. G. da P.; de Oliveira, T. B.; Arcuri, S. L.; de Morais, P. B.; Pagnocca, F. C. Yeasts in the nests of the leaf-cutter ant *Acromyrmex balzani* in a Savanna biome: exploitation of community and metabolic diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2021, *114* (6), 751–764. https://doi.org/10.1007/s10482-021-01555-1.
- (113) Currie, C. R.; Scottt, J. A.; Summerbell, R. C.; Malloch, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* **1999**, *398* (6729), 701–704. https://doi.org/10.1038/19519.
- (114) Seipke, R. F.; Barke, J.; Brearley, C.; Hill, L.; Yu, D. W.; Goss, R. J. M.; Hutchings, M. I. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One* **2011**, *6* (8), e22028. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022028.
- (115) Barke, J.; Seipke, R. F.; Grüschow, S.; Heavens, D.; Drou, N.; Bibb, M. J.; Goss, R. J.; Yu, D. W.; Hutchings, M. I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol* 2010, *8* (109), 1–10. https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-109.
- (116) Poulsen, M.; Cafaro, M. J.; Erhardt, D. P.; Little, A. E. F.; Gerardo, N. M.; Tebbets, B.; Klein, B. S.; Currie, C. R. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasiteinduced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Environ Microbiol Rep* **2009**, *2*(4), 534– 540. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x.
- (117) Sit, C. S.; Ruzzini, A. C.; Arnam, E. B. Van; Ramadhar, T. R.; Currie, C. R.; Clardy, J.; Sit, C. S.; Ruzzini, A. C.; Arnam, E. B. Van; Ramadhar, T. R.; Currie, C. R. Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**, *112* (43), 13150–13154. https://doi.org/10.1073/pnas.1521903112.
- (118) Schoenian, I.; Spiteller, M.; Ghaste, M.; Wirth, R.; Herz, H.; Spiteller, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, *108* (5), 1955–1960. https://doi.org/10.1073/pnas.1008441108.
- (119) Oh, D. C.; Poulsen, M.; Currie, C. R.; Clardy, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (6), 391–393. https://doi.org/10.1038/nchembio.159.
- Bae, M.; Mevers, E.; Pishchany, G.; Whaley, S. G.; Rock, C. O.; Andes, D. R.; Currie, C. R.; Pupo, M. T.; Clardy, J. Chemical exchanges between multilateral symbionts. *Org Lett* 2021, 23(5), 1648–1652. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00068.
- (121) Haeder, S.; Wirth, R.; Herz, H.; Spiteller, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, *106* (12), 4742–4746. https://doi.org/10.1073/pnas.0812082106.
- (122) Ortega, H. E.; Ferreira, L. L. G.; Melo, W. G. P.; Oliveira, A. L. L.; Ramos Alvarenga, R. F.; Lopes, N. P.; Bugni, T. S.; Andricopulo, A. D.; Pupo, M. T. Antifungal compounds from

*Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis* **2019**, *13*(8), e0007643. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007643.

- (123) Ortega, H. E.; Lourenzon, V. B.; Chevrette, M. G.; Ferreira, L. L. G.; Alvarenga, R. F. R.; Melo, W. G. P.; Venâncio, T.; Currie, C. R.; Andricopulo, A. D.; Bugni, T. S.; Pupo, M. T. Antileishmanial macrolides from ant-associated *Streptomyces* sp. ISID311. *Bioorg Med Chem* 2021, *32*, 116016. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116016.
- (124) Heine, D.; Holmes, N. A.; Worsley, S. F.; Santos, A. C. A.; Innocent, T. M.; Scherlach, K.; Patrick, E. H.; Yu, D. W.; Murrell, J. C.; Vieria, P. C.; Boomsma, J. J.; Hertweck, C.; Hutchings, M. I.; Wilkinson, B. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nat Commun* **2018**, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1.
- (125) Boya, C. A.; Fernández-Marín, H.; Mejiá, L. C.; Spadafora, C.; Dorrestein, P. C.; Gutiérrez, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungusgrowing ants. *Sci Rep* 2017, 7(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05515-6.
- (126) Dhodary, B.; Schilg, M.; Wirth, R.; Spiteller, D. Secondary Metabolites from Escovopsis weberi and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. *Chemistry A European Journal* **2018**, *24*(17), 4445–4452. https://doi.org/10.1002/chem.201706071.
- (127) Freinkman, E.; Oh, D. C.; Scott, J. J.; Currie, C. R.; Clardy, J. Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria* sp. associated with the fungus-growing ant, *Apterostigma dentigerum*. *Tetrahedron Lett* **2009**, *50* (49), 6834–6837. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.120.
- (128) Nair, M. S. R.; Hervey, A. Structure of lepiochlorin, an antibiotic metabolite of a fungus cultivated by ants. *Phytochemistry* **1979**, *18* (2), 326–327. https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80085-0.
- (129) Weber, N. A. Fungus-growing ants and their fungi: *Cyphomyrmex costatus. Ecology* **1957**, *38*(3), 480. https://doi.org/10.2307/1929893.
- (130) Wang, Y.; Mueller, U. G.; Clardy, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. J Chem Ecol **1999**, 25 (4), 935–941. https://doi.org/10.1023/A:1020861221126.
- (131) Brill, G. M.; Kati, W. M.; Montgomery, D.; Karwowski, J. P.; Humphrey, P. E.; Jackson, M.; Clement, J. J.; Kadam, S.; Chen, R. H.; McAlpine, J. B. Novel triterpene sulfates from *Fusarium compactum* using a rhinovirus 3C protease inhibitor screen. *J Antibiot* 1996, 49 (6), 541–546. https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.541.
- (132) Jiménez-Arreola, B. S.; Aguilar-Ramírez, E.; Cano-Sánchez, P.; Morales-Jiménez, J.; González-Andrade, M.; Medina-Franco, J. L.; Rivera-Chávez, J. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and *in silico* studies. *Bioorg Chem* **2020**, *101*, 103893. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893.
- (133) Hernando-Amado, S.; Coque, T. M.; Baquero, F.; Martínez, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 2019, 4(9), 1432–1442. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9.
- (134) Zhen, X.; Lundborg, C. S.; Sun, X.; Hu, X.; Dong, H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019, 8(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0590-7.
- (135) American Chemical Society. *Reagent chemicals: American Chemical Society specifications*, 10th ed.; Oxford University Press: Nueva York, Nueva York, EUA, **2006**.

- (136) Esri; DigitalGlobe; GeoEye; i-cubed; USDA FSA; USGS; AEX; Getmapping; Aerogrid; IGN; IGP; swisstopo; GIS User Community. *World Imagery*. https://www.arcgis.com/home/item.html?id=10df2279f9684e4a9f6a7f08febac2a9 (consultado el 2025-02-27).
- (137) Duff, L. B.; Urichuk, T. M.; Hodgins, L. N.; Young, J. R.; Untereiner, W. A. Diversity of fungi from the mound nests of *Formica ulkei* and adjacent non-nest soils. *Can J Microbiol* 2016, 62(7), 562–571. https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0628.
- (138) Rodrigues, A.; Passarini, M. R. Z.; Ferro, M.; Nagamoto, N. S.; Forti, L. C.; Bacci, M.; Sette, L. D.; Pagnocca, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. *J Basic Microbiol* 2014, *54* (11), 1186–1196. https://doi.org/10.1002/jobm.201200458.
- (139) King, J. R.; Porter, S. D. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (*Hymenoptera, Formicidae*). *Insect Soc* **2004**, *51* (2), 197–202. https://doi.org/10.1007/s00040-003-0709-x.
- (140) Van Borm, S.; Billen, J.; Boomsma, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex leafcutter* ants. *BMC Evol Biol* **2002**, *2*(9), 1–11. https://doi.org/10.1186/1471-2148-2-9.
- (141) Mankowski, M. E.; Morrell, J. J. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. *Mycologia* **2004**, *96* (2), 226–231. https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832972.
- (142) Bolton, B. *Identification guide to the ant genera of the world*; Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, USA, **1994**.
- (143) Lacap, D. C.; Hyde, K. D.; Liew, E. C. Y. An evaluation of the fungal "morphotype" concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers* **2003**, *12*, 53–66.
- (144) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod* 2017, *80*(3), 756– 770. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- (145) Watanabe, T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi*; CRC Press: Boca Ratón, Florida, EUA, **2010**. https://doi.org/10.1201/EBK1439804193.
- (146) Martínez-Aldino, I. Y.; Villaseca-Murillo, M.; Morales-Jiménez, J.; Rivera-Chávez, J. Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphtopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorg Chem* **2021**, *115*, 105166. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105166.
- (147) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapono, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B.T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; P, C. A. B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.;

Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. O.; Pogliano, K.; Linington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, *34* (8), 828–837. https://doi.org/10.1038/nbt.3597.

- (148) Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat Prod Rep* **2019**, *36*(7), 960–980. https://doi.org/10.1039/c9np00006b.
- (149) Rivera-Chávez, J.; Bustos-Brito, C.; Aguilar-Ramírez, E.; Martínez-Otero, D.; Rosales-Vázquez, L. D.; Dorazco-González, A.; Cano-Sánchez, P. Hydroxy-*neo*-Clerodanes and 5,10-*seco-neo*-Clerodanes from *Salvia decora. J Nat Prod* **2020**, *83* (7), 2212–2220. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00313.
- (150) Aron, A. T.; Gentry, E. C.; McPhail, K. L.; Nothias, L. F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F.; van der Hooft, J. J. J.; Ernst, M.; Kang, K. Bin; Aceves, C. M.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Koester, I.; Weldon, K. C.; Bertrand, S.; Roullier, C.; Sun, K.; Tehan, R. M.; Boya P, C. A.; Christian, M. H.; Gutiérrez, M.; Ulloa, A. M.; Tejeda Mora, J. A.; Mojica-Flores, R.; Lakey-Beitia, J.; Vásquez-Chaves, V.; Zhang, Y.; Calderón, A. I.; Tayler, N.; Keyzers, R. A.; Tugizimana, F.; Ndlovu, N.; Aksenov, A. A.; Jarmusch, A. K.; Schmid, R.; Truman, A. W.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat Protoc* 2020, *15*(6), 1954–1991. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5.
- (151) Chambers, M. C.; MacLean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.; Tasman, N.; Shulman, N.; Frewen, B.; Baker, T. A.; Brusniak, M. Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Moulding, C.; Seymour, S. L.; Nuwaysir, L. M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E. W.; Moritz, R. L.; Katz, J. E.; Agus, D. B.; MacCoss, M.; Tabb, D. L.; Mallick, P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 2012, *30*(10), 918–920. https://doi.org/10.1038/nbt.2377.
- (152) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003, *13* (11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.
- (153) Blaženović, I.; Kind, T.; Ji, J.; Fiehn, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites* **2018**, *8* (2), 31. https://doi.org/10.3390/metabo8020031.
- (154) Ito, T.; Masubuchi, M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *J Antibiot* **2014**, *67*(5), 353–360. https://doi.org/10.1038/ja.2014.12.
- (155) Lee, S.; van Santen, J. A.; Farzaneh, N.; Liu, D. Y.; Pye, C. R.; Baumeister, T. U. H.; Wong, W. R.; Linington, R. G. NP Analyst: An open online platform for compound activity mapping. *ACS Cent Sci* 2022, 8(2), 223–234. https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01108.
- (156) Cruz-Muñiz, M. Y.; López-Jacome, L. E.; Hernández-Durán, M.; Franco-Cendejas, R.; Licona-Limón, P.; Ramos-Balderas, J. L.; Martinéz-Vázquez, M.; Belmont-Díaz, J. A.; Wood, T. K.; García-Contreras, R. Repurposing the anticancer drug mitomycin C for the treatment of persistent *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2017, *49*(1), 88–92. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.022.

- (157) CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 12th ed.; CLSI: Wayne, Pensilvania, EUA, **2024**.
- (158) Lambert, R. J. W.; Pearson, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol* **2000**, *88* (5), 784–790. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x.
- (159) Leber, A. L. *Clinical microbiology procedures handbook*; American Society for Microbiology Press: Washington, EUA, **2016**.
- (160) De Silva, E. D.; Geiermann, A.-S.; Mitova, M. I.; Kuegler, P.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Munro, M. H. G. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. *J Nat Prod* 2009, *72*(3), 477–479. https://doi.org/10.1021/np800627f.
- (161) Hosoya, R.; Yugami, T.; Yoshida, S.; Yaguchi, T.; Komuro, K.; Sasaki, T. Fungicide PF1140 manufacture with *Eupenicillium*. Patente Japonesa 07267962, 1996.
- (162) Nonaka, K.; Chiba, T.; Suga, T.; Asami, Y.; Iwatsuki, M.; Masuma, R.; Ōmura, S.; Shiomi, K. Coculnol, a new penicillic acid produced by a coculture of *Fusarium solani* FKI-6853 and *Talaromyces* sp. FKA-65. *J Antibiot* **2015**, *68* (8), 530–532. https://doi.org/10.1038/ja.2015.15.
- (163) Pohland, A. E.; Schuller, P. L.; Steyn, P. S.; Van Egmond, H. P. Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure Appl Chem* **1982**, *54* (11), 2219–2284. https://doi.org/10.1351/pac198254112219.
- (164) Glaser, R.; Shiftan, D.; Froimowitz, M. NMR structure determination of brefeldin-A, a 13membered ring fungal metabolite. *Magn Reson Chem* 2000, *38* (4), 274–280. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(200004)38:4<274::AID-MRC630>3.0.CO;2-M.
- (165) Vurro, M.; Evidente, A.; Andolfi, A.; Chiara Zonno, M.; Giordano, F.; Motta, A. Brefeldin A and α,β-dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. *Plant Science* **1998**, *138*(1), 67–79. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00131-9.
- (166) Li, D.; Chen, Y.; Tao, M.; Li, H.; Zhang, W. Two new octahydronaphthalene derivatives from *Trichoderma spirale*, an endophytic fungus derived from *Aquilaria sinensis*. *Helv Chim Acta* **2012**, *95* (5), 805–809. https://doi.org/10.1002/hlca.201100417.
- (167) Garo, E.; Starks, C. M.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens. J Nat Prod* **2003**, *66* (3), 423–426. https://doi.org/10.1021/np0204390.
- (168) Liu, R.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M.; Cui, C.-B.; Fan, G.-T. Trichodermamide A and aspergillazine A, two cytotoxic modified dipeptides from a marine-derived fungus *Spicaria elegans*. *Arch Pharm Res* 2005, *28*(9), 1042–1046. https://doi.org/10.1007/BF02977399.
- (169) Ohashi, Y.; Iijima, H.; Yamaotsu, N.; Yamazaki, K.; Sato, S.; Okamura, M.; Sugimoto, K.; Dan, S.; Hirono, S.; Yamori, T. AMF-26, a novel inhibitor of the Golgi system, targeting ADPribosylation factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. *J Biol Chem* **2012**, *287* (6), 3885–3897. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316125.
- (170) Yamada, N. Octahydronaphthalene derivative and medicine. WO2005070856A1, 2005.
- (171) Sofian, F. F.; Warahapsari, F. A.; Yoshida, J.; Ito, Y.; Koseki, T.; Shiono, Y. Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acids C and D produced by *Trichoderma* sp. HN-1.1. *Nat Prod Res* 2021, *37* (3), 484–493. https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1983811.
- (172) Shiina, I.; Umezaki, Y.; Ohashi, Y.; Yamazaki, Y.; Dan, S.; Yamori, T. Total synthesis of AMF-26, an antitumor agent for inhibition of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation factor 1. *J Med Chem* 2013, *56*(1), 150–159. https://doi.org/10.1021/jm301695c.

- (173) Franck, X.; Vaz Araujo, M. E.; Jullian, J.-C.; Hocquemiller, R.; Figadère, B. Synthesis and structure determination of *iso*-cladospolide B. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42*(15), 2801–2803. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00323-9.
- (174) Smith, C. J.; Abbanat, D.; Bernan, V. S.; Maiese, W. M.; Greenstein, M.; Jompa, J.; Tahir, A.; Ireland, C. M. Novel polyketide metabolites from a species of marine fungi. *J Nat Prod* 2000, 63(1), 142–145. https://doi.org/10.1021/np990361w.
- (175) Steve Bogart. SankeyMATIC. https://sankeymatic.com/about/ (consultado el 2024-10-21).
- (176) VIB-UGent Center. *Venn diagram.* https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/ (consultado el 2024-10-21).
- (177) Manson, R. H.; Hernández Ortiz, V.; Gallina, S.; Mehltreter, K. Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz biodiversidad, manejo y conservación; INECOL-SEMARNAT: Veracruz, México, 2008.
- (178) García-Franco, J. G.; Castillo-Campos, G.; Mehltreter, K.; Martínez, M. L.; Vázquez, G. Estructura y composición de un bosque mesófilo del centro de Veracruz, México. *Bol Soc Bot México* 2008, *52* (83), 37-52.
- (179) California Academy of Science. *AntWeb*. https://www.antweb.org/ (consultado el 2024-04-13).
- (180) Carrión, G.; Quiroz, L.; Valenzuela, J. Hongos entomopatógenos de las hormigas arrieras. *Rev. Mex. Mic.* **1996**, *12*, 41–48.
- (181) Espinoza, C.; Zavala-Izquierdo, I.; Couttolenc, A.; Landa-Cadena, G.; Valenzuela, J.; Trigos,
  A. *In vitro* isolation and identification of *Leucoagaricus gongylophorus* from *Atta mexicana* (*Hymenoptera: Formicidae*) fungal garden. *Sci Fungorum* 2017, *46*, 3–8.
- (182) Arias Mota, R. M.; Abarca, G. H. Diversity of soil culturable fungi in the tropical montane cloud forest of Veracruz, Mexico. *Sci Fungorum* **2020**, *50*, e1290. https://doi.org/10.33885/sf.2020.50.1290.
- (183) Samain, M.; Castillo Campos G. *Biodiversidad del Santuario del Bosque de Niebla Xalapa, Veracruz*; Instituto de Ecología, A. C.: Xalapa, México, **2020**.
- (184) Montoya, L.; Bandala, V. M.; Baroni, T. J.; Horton, T. R. A new species of *Laccaria* in montane cloud forest from eastern Mexico. *Mycoscience* **2015**, *56* (6), 597–605. https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.06.002.
- (185) Woolfolk, S.; Stokes, C. E.; Watson, C.; Baker, G.; Brown, R.; Baird, R. Fungi associated with *Solenopsis invicta* Buren (red imported fire ant, *Hymenoptera: Formicidae*) from mounds in Mississippi. *Southeast* Nat **2016**, *15*(2), 220–234. https://doi.org/10.1656/058.015.0203.
- (186) Bamisile, B. S.; Siddiqui, J. A.; Nie, L.; Idrees, A.; Aguila, L. C. R.; Jia, C.; Xu, Y. Baseline analysis of endophytic fungal associates of *Solenopsis invicta* Buren from mounds across five counties of Guangdong province, China. *J. Fungi.* **2023**, *9* (3), 377. https://doi.org/10.3390/jof9030377.
- (187) Sokolova, Y. Y.; Fuxa, J. R. Biology and life-cycle of the microsporidium *Kneallhazia* solenopsae Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., from the fire ant *Solenopsis invicta*. *Parasitology* **2008**, *135* (8), 903–929. https://doi.org/10.1017/S003118200800440X.
- (188) Hughes, W. O. H.; Thomsen, L.; Eilenberg, J.; Boomsma, J. J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. anisopliae. *J Invertebr Pathol* **2004**, *85* (1), 46–53. https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.005.
- (189) Kobmoo, N.; Mongkolsamrit, S.; Wutikhun, T.; Tasanathai, K.; Khonsanit, A.; Thanakitpipattana, D.; Luangsa-Ard, J. J. New species of *Ophiocordyceps unilateralis*, an ubiquitous pathogen of ants from Thailand. *Fungal Biol* **2015**, *119* (1), 44–52. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.10.008.

- (190) Humber, R. A. Special considerations for operating a culture collection of fastidious fungal pathogens. *J Ind Microbiol* **1994**, *13* (3), 195–196. https://doi.org/10.1007/BF01584009.
- (191) Turchetti, B.; Bevivino, A.; Casella, P.; Coleine, C.; Felis, G. E.; Girometta, C. E.; Molino, A.; Perugini, I.; Pollio, A.; Prigione, V.; Selbmann, L.; Varese, G. C.; Buzzini, P. Selected case studies on fastidious eukaryotic microorganisms: Issues and investigation strategies. *Diversity (Basel)* 2023, *15*(7), 862. https://doi.org/10.3390/d15070862.
- (192) Lindström, S.; Timonen, S.; Sundström, L.; Johansson, H. Ants reign over a distinct microbiome in forest soil. *Soil Biol Biochem* **2019**, *139*, 107529. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107529.
- (193) Aguilar-Colorado, Á. S.; Morales-Jiménez, J.; Rivera-Chávez, J. Harnessing molecular and bioactivity network analysis to prioritize antibacterial compound isolation from antassociated fungi. *Phytochem Anal* **2025**, *Epub ahead of print*, 1–16. https://doi.org/10.1002/pca.3513.
- (194) Cycoń, M.; Mrozik, A.; Piotrowska-Seget, Z. Antibiotics in the soil environment degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol* **2019**, *10* (MAR), 338. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338.
- (195) Zhu, Y.-G.; Zhao, Y.; Zhu, D.; Gillings, M.; Penuelas, J.; Ok, Y. S.; Capon, A.; Banwart, S. Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environ Int* **2019**, *131*, 105059. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059.
- (196) Valencia-Mejía, E.; León-Wilchez, Y. Y.; Monribot-Villanueva, J. L.; Ramírez-Vázquez, M.; Bonilla-Landa, I.; Guerrero-Analco, J. A. Isolation and identification of pennogenin tetraglycoside from *Cestrum nocturnum* (*Solanaceae*) and its antifungal activity against *Fusarium kuroshium*, causal agent of *Fusarium* dieback. *Molecules* 2022, *27* (6), 1860. https://doi.org/10.3390/molecules27061860.
- (197) Bergkessel, M.; Forte, B.; Gilbert, I. H. Small-molecule antibiotic drug development: need and challenges. *ACS Infect Dis* **2023**, *9* (11), 2062–2071. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00189.
- (198) Caesar, L. K.; Cech, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep* **2019**, *36* (6), 869–888. https://doi.org/10.1039/C9NP00011A.
- (199) Fujita, Y.; Oguri, H.; Oikawa, H. Biosynthetic studies on the antibiotics PF1140: a novel pathway for a 2-pyridone framework. *Tetrahedron Lett* **2005**, *46* (35), 5885–5888. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.06.115.
- (200) Fujita, Y.; Oguri, H.; Oikawa, H. The relative and absolute configuration of PF1140. *JAntibiot* **2005**, *58* (6), 425–427. https://doi.org/10.1038/ja.2005.56.
- (201) Lindsay, C. A.; Tan, C. Y.; Krishnan, D.; Uchenik, D.; Anaya Eugenio, G. D.; Salinas, E. D.; Carcache de Blanco, E. J.; Kinghorn, A. D.; Rakotondraibe, H. L. Steroids and epicoccarines from *Penicillium aurantiancobrunneum*. *Phytochem Lett* **2024**, *63*, 79–86. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2024.08.008.
- (202) Yokoyama, Y.; Koseki, T.; Harneti, D.; Maharani, R.; Supratman, U.; Shiono, Y. Phytotoxic compounds isolated from a sea snail derived fungus, *Penicillium vancouverense* YY-1. *Phytochem Lett* **2020**, *39*, 57–63. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.008.
- (203) Peramuna, T.; Kim, C. M.; Aguila, L. K. T.; Wendt, K. L.; Wood, G. E.; Cichewicz, R. H. Iron(III) binding properties of PF1140, a fungal *N*-hydroxypyridone, and activity against *Mycoplasma genitalium*. *J Nat Prod* **2024**, *87* (7), 1746–1753. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c00209.
- (204) Demir, Ö.; Schulz, B.; Rabsch, L.; Steinert, M.; Surup, F. Strong antagonism of an endophyte of *Fraxinus excelsior* towards the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, is

mediated by the antifungal secondary metabolite PF1140. *Appl Environ Microbiol* **2024**, *90* (6), 1–13. https://doi.org/10.1128/aem.00665-24.

- (205) Zhu, Y. X.; Peng, C.; Ding, W.; Hu, J.-F.; Li, J. Chromenopyridin A, a new *N*-methoxy-1pyridone alkaloid from the endophytic fungus *Penicillium nothofagi* P-6 isolated from the critically endangered conifer *Abies beshanzuensis*. *Nat Prod Res* **2022**, *36*(8), 2049–2055. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1844700.
- (206) Frisvad, J. C. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin J* **2018**, *11* (1), 73–100. https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294.
- (207) Zhang, D.; Sun, W.; Xu, W.; Ji, C.; Zhou, Y.; Sun, J.; Tian, Y.; Li, Y.; Zhao, F.; Tian, Y. Antimicrobial and cytotoxic activity of endophytic fungi from *Lagopsis supina*. *J Microbiol Biotechnol* **2023**, *33*(4), 543–551. https://doi.org/10.4014/jmb.2211.11055.
- (208) Chan, P. K.; Reddy, C. S.; Hayes, A. W. Acute toxicity of penicillic acid and its interaction with pentobarbital and other compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* **1980**, *52* (1), 1–9. https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90240-9.
- (209) Birkinshaw, J. H.; Oxford, A. E.; Raistrick, H. Studies in the biochemistry of microorganisms. *Biochem J* **1936**, *30*(3), 394–411. https://doi.org/10.1042/bj0300394.
- (210) Xie, J.; Wu, Y. Y.; Zhang, T. Y.; Zhang, M. Y.; Zhu, W. W.; Gullen, E. A.; Wang, Z. J.; Cheng, Y. C.; Zhang, Y. X. New and bioactive natural products from an endophyte of *Panax notoginseng. RSC Adv* 2017, 7(60), 38100–38109. https://doi.org/10.1039/c7ra07060h.
- (211) Singleton, V. L.; Bohonos, N.; Ullstrup, A. J. Decumbin, a new compound from a species of *Penicillium. Nature* **1958**, *181* (4615), 1072–1073. https://doi.org/10.1038/1811072a0.
- (212) Betina, V. Biological effects of the antibiotic brefeldin A (decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): a retrospective. *Folia Microbiol (Praha)* **1992**, *37* (1), 3–11. https://doi.org/10.1007/BF02814572.
- (213) Shi, J. Y.; Wang, C. F.; Xie, M. M.; Hao, Y. J.; Wang, N.; Ma, H. Bin; Yang, X. W. Brefeldin A from the deep-sea-derived fungus *Fusarium* sp. targets on RIPK3 to inhibit TNFα-induced necroptosis. *Chem Biodivers* **2022**, *19* (10), e202200696. https://doi.org/10.1002/cbdv.202200696.
- (214) Mabuni, C. T.; Garlaschelli, L.; Ellison, R. A.; Hutchinson, C. R. Biosynthetic origin of the oxygen atoms in the C15 macrolide antibiotic brefeldin A. *J Am Chem Soc* **1977**, *99* (23), 7718–7720. https://doi.org/10.1021/ja00465a058.
- (215) Jang, B.-G.; Choi, B.; Kim, S.; Lee, D.-S.; Lee, J.; Koh, Y. H.; Jo, S. A.; Kim, J.-E.; Kang, T.-C.; Kim, M.-J. 2,4-Diacetylphloroglucinol reduces beta-amyloid production and secretion by regulating ADAM10 and intracellular trafficking in cellular and animal models of alzheimer's disease. *Cells* **2022**, *11* (16), 2585. https://doi.org/10.3390/cells11162585.
- (216) Al Zaidi, M.; Pizarro, C.; Bley, C.; Repges, E.; Sedaghat, A.; Zimmer, S.; Jansen, F.; Tiyerili, V.; Nickenig, G.; Skowasch, D.; Aksoy, A. ER-stress-induced secretion of circulating glucose-regulated protein 78kDa (GRP78) ameliorates pulmonary artery smooth muscle cell remodelling. *Cell Stress Chaperones* 2022, *27* (5), 561–572. https://doi.org/10.1007/s12192-022-01292-y.
- (217) Abbineni, P. S.; Tang, V. T.; da Veiga Leprevost, F.; Basrur, V.; Xiang, J.; Nesvizhskii, A. I.; Ginsburg, D. Identification of secreted proteins by comparison of protein abundance in conditioned media and cell lysates. *Anal Biochem* **2022**, *655*, 114846. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114846.
- (218) Isaka, M.; Tanticharoen, M.; Kongsaeree, P.; Thebtaranonth, Y. Structures of cordypyridones A–D, antimalarial *N*-hydroxy- and *N*-methoxy-2-pyridones from the insect

pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. *J Org Chem* **2001**, *66* (14), 4803–4808. https://doi.org/10.1021/jo0100906.

- (219) Teshima, Y.; Shin-Ya, K.; Shimazu, A.; Furihata, K.; Chul, H. S.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Nagai, K.; Seto, H. Isolation and structural elucidation of pyridoxatin, a free radical scavenger of microbial origin. *J Antibiot* **1991**, *44* (6), 685–687. https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.685.
- (220) Cai, P.; Smith, D.; Cunningham, B.; Brown-Shimer, S.; Katz, B.; Pearce, C.; Venables, D.; Houck, D. 8-methyl-pyridoxatin: a novel *N*-hydroxy pyridone from fungus OS-F61800 that induces erythropoietin in human cells. *J Nat Prod* **1999**, *62* (2), 397–399. https://doi.org/10.1021/np980450t.
- (221) Wagenaar, M. M.; Gibson, D. M.; Clardy, J. Akanthomycin, a new antibiotic pyridone from the entomopathogenic fungus *Akanthomyces gracilis*. *Org Lett* **2002**, *4* (5), 671–673. https://doi.org/10.1021/ol016737q.
- McBrien, K. D.; Gao, Q.; Huang, S.; Klohr, S. E.; Wang, R. R.; Pirnik, D. M.; Neddermann, K. M.; Bursuker, I.; Kadow, K. F.; Leet, J. E. Fusaricide, a new cytotoxic *N*-hydroxypyridone from *Fusarium* sp. *J Nat Prod* **1996**, *59* (12), 1151–1153. https://doi.org/10.1021/np960521t.
- (223) Qiao, Y.; Xu, Q.; Feng, W.; Tao, L.; Li, X.-N.; Liu, J.; Zhu, H.; Lu, Y.; Wang, J.; Qi, C.; Xue, Y.; Zhang, Y. Asperpyridone A: an unusual pyridone alkaloid exerts hypoglycemic activity through the insulin signaling pathway. *J Nat Prod* **2019**, *82* (10), 2925–2930. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00188.
- (224) Wu, B.; Oesker, V.; Wiese, J.; Schmaljohann, R.; Imhoff, J. Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. *Mar Drugs* **2014**, *12*(3), 1208–1219. https://doi.org/10.3390/md12031208.
- (225) TePaske, M. R.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; Dowd, P. F. Leporin A: an antiinsectan *N*-alkoxypyridone from the sclerotia of *Aspergillus leporis*. *Tetrahedron Lett* **1991**, *32* (41), 5687–5690. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)93530-5.
- (226) Zhang, C.; Jin, L.; Mondie, B.; Mitchell, S. S.; Castelhano, A. L.; Cai, W.; Bergenhem, N. Leporin B: a novel hexokinase II gene inducing agent from an unidentified fungus. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*(8), 1433–1435. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00153-7.
- (227) Yamazaki, H.; Rotinsulu, H.; Narita, R.; Takahashi, R.; Namikoshi, M. Induced production of halogenated epidithiodiketopiperazines by a marine-derived *Trichoderma* cf. *brevicompactum* with sodium halides. *J Nat Prod* **2015**, *78* (10), 2319–2321. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00669.
- Huang, L.; Chen, C.; Cai, J.; Chen, Y.; Zhu, Y.; Yang, B.; Zhou, X.; Liu, Y.; Tao, H. Discovery of enzyme inhibitors from mangrove sediment derived fungus *Trichoderma harzianum* SCSIO 41051. *Chem Biodivers* 2024, *21* (4), e202400070. https://doi.org/10.1002/cbdv.202400070.
- (229) Zhu, M.; Yang, Z.; Feng, H.; Gan, Q.; Che, Q.; Zhu, T.; Gu, Q.; Han, B.; Li, D. Trichodermamides D-F, heterocyclic dipeptides with a highly functionalized 1,2oxazadecaline core isolated from the endophytic fungus *Penicillium janthinellum* HDN13-309. *RSC Adv* **2017**, *7*(76), 48019–48024. https://doi.org/10.1039/c7ra10389a.
- (230) Yan, L.-H.; Li, X.; Wang, B.-G. Natural products with 1,2-oxazine scaffold: occurrence, chemical diversity, bioactivity, synthesis, and biosynthesis. *Nat Prod Rep* **2023**, *40* (12), 1874–1900. https://doi.org/10.1039/D3NP00023K.
- (231) Wu, J.-L.; Yu, Y.-H.; Yao, H.-Z.; Zhao, X.; Yuan, T.; Huang, Y.-H. Trichodermic acids from an endophytic *Trichoderma* sp. and their antifungal activity against the phytopathogen
*Botrytis cinerea. Phytochem Lett* **2023**, *56*, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.06.004.

- (232) Zhao, T.; Xu, L.-L.; Zhang, Y.; Lin, Z.-H.; Xia, T.; Yang, D.-F.; Chen, Y.-M.; Yang, X.-L. Three new *a* -pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Penicillium ochrochloronthe* and their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. *J Asian Nat Prod Res* 2019, *21* (9), 851–858. https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1495197.
- (233) Dai, H.; Kang, Q.; Li, G.; Shen, Y. Three new polyketide metabolites from the endophytic fungal strain *Cladosporium tenuissimum* LR463 of *Maytenus hookeri*. *Helv Chim Acta* 2006, *89*(3), 527–531. https://doi.org/10.1002/hlca.200690055.
- (234) Reddy, C. R.; Suman, D.; Rao, N. N. Alkyne-mediated approach for total syntheses of cladospolides A, B, C and *iso*-cladospolide B. *European J Org Chem* **2013**, *2013*(18), 3786–3796. https://doi.org/10.1002/ejoc.201300022.
- (235) Prasad, K. R.; Gandi, V. R. Enantioselective total synthesis of *iso*-cladospolide B, cladospolide C and cladospolide B from tartaric acid. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22*(5), 499–505. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2011.02.018.
- (236) Sharma, G. V. M.; Laxmi Reddy, K.; Janardhan Reddy, J. First synthesis and determination of the absolute stereochemistry of *iso*-cladospolide-B and cladospolides-B and C. *Tetrahedron Lett* **2006**, *47*(37), 6537–6540. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.07.044.
- (237) Cao, X.; Guo, L.; Cai, C.; Kong, F.; Yuan, J.; Gai, C.; Dai, H.; Wang, P.; Mei, W. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. HNWSW-1. *Front Chem* **2021**, *9*, 1– 8. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.773703.
- (238) Han, P.; Zhang, X.; Xu, D.; Zhang, B.; Lai, D.; Zhou, L. Metabolites from *Clonostachys* fungi and their biological activities. *J. Fungus.* **2020**, *6* (4), 229. https://doi.org/10.3390/jof6040229.
- (239) Repac Antić, D.; Parčina, M.; Gobin, I.; Petković Didović, M. Chelation in antibacterial drugs: from nitroxoline to cefiderocol and beyond. *Antibiotics* **2022**, *11* (8), 1105. https://doi.org/10.3390/antibiotics11081105.
- Hui, Y.; Tang, T.; Wang, J.; Zhao, H.; Yang, H.-Y.; Xi, J.; Zhang, B.; Fang, J.; Gao, K.; Wu, Y. Fusaricide is a novel iron chelator that induces apoptosis through activating caspase-3. J Nat Prod 2021, 84 (8), 2094–2103. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01322.

# **ANEXOS**

Hormiga y nido	Fecha y hora*	Tiempo	Latitud	Longitud	Altitud (m s. n. m.)	Predio*	Vegetación	Especie de hormiga $^*_{**}$
1	Junio 9, 11:14	Soleado	19.3659342	-96.9787431	1101.13	Teocelo, Baxtla, Rancho El Águila	Potrero arbolado	Solenopsis geminata
2	Junio 9, 12:02	Soleado	19.3657226	-96.9789610	1101.44	Teocelo, Baxtla, Rancho El Águila	Potrero arbolado	S. geminata
3	Junio 9, 12:29	Soleado	19.3649590	-96.9793366	1113.51	Teocelo, Baxtla, Rancho El Águila	Potrero arbolado	Dorymyrmex bicolor
4	Junio 9, 12:56	Soleado	19.3649749	-96.9801952	1116.42	Teocelo, Blaxtla, Rancho El Águila	Potrero arbolado	S. geminata
5	Junio 9, 14:35	Soleado	19.3548544	-96.9791197	1146.00	Teocelo, Baxtla, Finca Los Magueyes	Cafetal	S. geminata
6	Junio 9, 15:05	Soleado	19.3545986	-96.9785548	1155.93	Teocelo, Baxtla, Finca Los Magueyes	Cafetal	S. geminata
7	Junio 10, 10:07	Nuboso	19.5129456	-96.9379752	1308.49	Xalapa, Santuario del Bosque de Niebla	Bosque de niebla	S. geminata
8†	Junio 10, 11:20	Nuboso	19.5123786	-96.9354510	1330.57	Xalapa, Santuario del Bosque de Niebla	Bosque de niebla	Nomamyrmex esenbeckii
9	Junio 11, 12:35	Nuboso	19.4590705	-96.9398001	1190.86	Coatepec, La Orduña	Camino agrícola	Atta mexicana
10	Junio 11, 14:12	Nuboso	19.4551456	-96.9391602	1191.69	Coatepec, La Orduña	Camino agrícola	A. mexicana
11	Junio 11, 16:57	Nuboso	19.4512825	-96.9304366	1153.25	Coatepec, La Orduña	Camino agrícola	A. mexicana
12†	Junio 12, 12:20	Nuboso	19.4540761	-96.9906414	1233.82	Coatepec, Hacienda El Trianón	Cafetal	Cheliomyrmex morosus
13	Junio 12, 12:22	Nuboso	19.4540652	-96.9904835	1236.74	Coatepec, Hacienda El Trianón	Cafetal	S. geminata
14	Junio 12, 14:07	Nuboso	19.4531033	-96.9921013	1266.64	Coatepec, Hacienda El Trianón	Cafetal	A. mexicana
15	Junio 12, 15:29	Nuboso	19.4545780	-96.9936207	1275.64	Coatepec, Hacienda El Trianón	Cafetal	A. mexicana

Anexo 1. Localización de los nidos y hormigas recolectados

Hormiga y nido	Fecha y hora*	Tiempo	Latitud	Longitud	Altitud (m s. n. m.)	Predio*	Vegetación	Especie de hormiga $^*_{**}$
16	Junio 13, 13:19	Nuboso	19.5190472	-96.9417664	1399.23	Xalapa, Parque El Haya	Parque ecológico	S. geminata
17	Junio 14, 14:07	Nuboso	19.4545534	-96.9935866	1295.57	Coatepec, Hacienda El Trianón	Cafetal	A. mexicana
18‡	Junio 11, 20:33	Nuboso	19.4518047	-96.9320550	1134.07	Coatepec, La Orduña	Camino agrícola	Camponotus sericeiventris

Anexo 1. Localización de los nidos y hormigas recolectados (continuación)

\* En el año 2021.

\* En Veracruz, México.

\*\* Ejemplares de cada especie fueron identificados, montados y depositados en la colección entomológica IEXA con el identificador de ingreso IEXA-2024-IM12.

† Hormiga legionaria de la que se recolectaron especímenes y tierra de su sendero.

‡ Hormiga carpintera de la que únicamente se recolectaron especímenes.

Contoo	Morfotipo	Origer	ı	Acerca del	cultivo a esca	ala pequeña	Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días Rendimiento incubado* Envase** del extracto†		A. baumannii	K. pneumoniae		
1	751	3	М	13, 24	1	27.3	19 ± 16	4.4 ± 4.3	
2	752	14	Т	13, 24	1	59	0 ± 0	14 ± 5.3	
3	753	3	А	13, 24	1	64.2	8.7 ± 6.4	0 ± 0	
4	754	5	М	13, 24	1	21.5	16.1 ± 4.6	0 ± 0	
5	755	2	А	13, 24	1	77.6	3.1 ± 2.8	14 ± 12.1	
6	756	9	М	13, 24	1	30.2	17.6 ± 2.8	0 ± 0	
7	757	17	А	13, 24	1	33.9	$14.2 \pm 4.4$	0 ± 0	
8	758	15	М	13, 24	1	17.6	$0.9 \pm 0.8$	19.2 ± 6.7	
9	759	9	А	13, 24	1	47.9	10.9 ± 5.6	0 ± 0	
10	760	10	А	13, 24	1	15.3	6.3 ± 8	1.3 ± 2.3	
11	761	4	А	13, 24	1	23.1	14.3 ± 6.5	0 ± 0	
12	762	17	Т	13, 24	1	17.9	3.7 ± 3.2	25.3 ± 0.3	
13	763	5	А	13, 24	1	24.9	47.1 ± 2.1	0 ± 0	
14	764	13	А	13, 24	1	37.1	0 ± 0	1.7 ± 3	
15	766	8	AT	13, 24	1	28.9	6.4 ± 2.9	0 ± 0	
16	767	4	М	13, 24	1	82.7	17.3 ± 2.7	0 ± 0	
17	768	1	М	13, 24	1	62	31.7 ± 2.7	$0.2 \pm 0.3$	
18	769	7	М	13, 24	1	19.6	2.3 ± 2.5	0.7 ± 1.3	
19	772	1	А	13, 24	1	106.1	1.9 ± 3.3	0 ± 0	
20	773	14	А	13, 24	1	19.8	11.5 ± 1.8	0 ± 0	
21	774	6	М	13, 24	1	42.3	13.1 ± 1.3	0 ± 0	
22	776	13	М	13, 25	2	32.9	7.5 ± 7.2	0 ± 0	
23	777	11	М	13, 25	2	31.1	25.6 ± 6.9	0 ± 0	
24	778	15	А	13, 25	2	43.7	5.7 ± 4.9	0 ± 0	
25	779	16	М	13, 25	2	44.2	12.9 ± 3.5	0 ± 0	
26	780	17	М	13, 24	1	55.7	43.3 ± 1.3	3.3 ± 5.6	
27	781	10	М	13, 25	2	63.6	15.8 ± 4.8	30.1 ± 9.5	
28	782	6	А	13, 25	2	59.9	14.2 ± 7.2	0 ± 0	
29	783	12	А	13, 25	2	19.7	12.4 ± 10	0 ± 0	
30	784	7	А	13, 25	2	18.7	24.8 ± 9.7	$0 \pm 0$	

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo

Conteo	Morfotipo	Origen		Acerca del	Acerca del cultivo a escala pequeña			Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado*	Envase **	Rendimiento del extracto†	A. bau	ımannii	K. pneumoniae	
31	785	3	М	1	3, 25	2	19.2	11.5 ± 1.2	0 ± 0	
32	786	3	А	1	3, 25	2	123.5	20.6 ± 4.2	12.5 ± 8.3	
33	787	5	М	1	3, 25	2	38.1	0.7 ± 0.7	6.2 ± 5.8	
34	788	9	М	1	3, 25	2	19.3	5.3 ± 5.2	0 ± 0	
35	789	17	А	1	3, 25	2	22.1	0.8 ± 1	0 ± 0	
36	790	15	М	1	3, 25	2	31.9	13.4 ± 11.6	0 ± 0	
37	793	17	Т	1	3, 25	2	60.1	11.2 ± 9.8	0 ± 0	
38	794	5	А	1	3, 25	2	21.4	26.6 ± 3.7	14.7 ± 7.9	
39	795	13	А	1	3, 25	2	37.5	35.3 ± 8.8	0 ± 0	
40	796	8	AT	1	3, 25	2	17	5.6 ± 8.5	0 ± 0	
41	797	4	М	1	3, 25	2	17.3	32.5 ± 5.4	0 ± 0	
42	799	12	AT	1	3, 27	1	21.3	10 ± 2.7	0 ± 0	
43	800	11	А	1	3, 27	1	15	0 ± 0	25.2 ± 3.5	
44	801	1	А	1	4, 26	2	49.4	3.6 ± 2	2.7 ± 4.6	
45	802	14	А	1	3, 27	1	9	4.1 ± 7.1	0 ± 0	
46	803	6	М	1	3, 27	2	17.8	32.4 ± 7.4	0 ± 0	
47	806	11	М	1	3, 27	1	25.9	33.8 ± 8.4	0 ± 0	
48	807	16	М	1	4,26	2	15.4	25.1 ± 3.5	0 ± 0	
49	808	17	М	1	1,33	1	17.3	12.6 ± 7.6	0 ± 0	
50	809	10	М	1	1,33	1	45.3	13.9 ± 4.3	4.7 ± 3.4	
51	810	6	А	1	3, 27	1	23.7	2.2 ± 2.8	$0.4 \pm 0.8$	
52	811	12	А	1	3, 27	1	34.9	16.9 ± 2	0 ± 0	
53	812	7	А	1	4, 26	2	34.2	45.6 ± 1.1	0 ± 0	
54	814	3	А	1	3, 27	2	39.1	66.7 ± 3.8	0 ± 0	
55	816	9	М	1	4, 26	2	26.4	16.5 ± 1.5	0 ± 0	
56	817	17	А	1	3, 27	2	51.3	8.3 ± 6	0 ± 0	
57	819	17	Т	1	4, 26	1	28.5	42.4 ± 4.2	0 ± 0	
58	820	13	А	1	4, 26	1	36.6	7.3 ± 8.8	2.9 ± 2.9	
59	821	8	AT	1	4, 26	2	37.7	20.8 ± 8.3	0 ± 0	

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Contoo	Morfotipo	ipo Origen		Acerca del	Acerca del cultivo a escala pequeña			Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado*	Envase **	Rendimiento del extracto†	A. bau	ımannii	K. pneumoniae	
60	822	4	М	1	3, 27	2	54.9	0.5 ± 0.5	0 ± 0	
61	823	7	М	1	4, 26	1	124.6	24.4 ± 1.4	18.4 ± 15.3	
62	824	12	AT	1	3, 27	1	13.3	9.9 ± 3.9	1.3 ± 2.3	
63	825	14	Α	1	3, 27	1	15	2.7 ± 2.4	26 ± 7.8	
64	826	6	М	1	3, 27	1	62.5	2 ± 2.3	0 ± 0	
65	827	13	М	1	3, 27	1	34.2	9.7 ± 1.7	3.3 ± 5.2	
66	829	6	Α	1	3, 27	1	25.2	25 ± 3.4	0 ± 0	
67	830	12	Α	1	3, 27	1	102.3	8.7 ± 5.8	7.1 ± 12.3	
68	832	3	Α	1	3, 27	1	42	20.1 ± 6.9	0 ± 0	
69	835	10	Α	1	3, 27	1	41.9	18.8 ± 1.6	12.7 ± 2.1	
70	836	17	Т	1	3, 27	1	31.8	22.5 ± 2.6	8.4 ± 2.3	
71	837	13	Α	1	3, 27	1	32.6	23.2 ± 1.7	0 ± 0	
72	838	8	AT	1	3, 27	1	34	2.3 ± 3.8	24.9 ± 2.5	
73	839	12	AT	1	3, 27	1	59.6	10.2 ± 5.9	0 ± 0	
74	840	6	М	1	3, 27	1	44.1	6.2 ± 2.7	0 ± 0	
75	841	13	М	1	3, 27	1	35	6.3 ± 10.8	0 ± 0	
76	842	11	М	1	3, 27	1	29.3	19.3 ± 5.3	0 ± 0	
77	843	6	Α	1	3, 27	1	28.8	28 ± 9.1	0 ± 0	
78	844	3	М	1	3, 27	1	60.1	3.2 ± 5.6	$26.2 \pm 0.4$	
79	846	9	М	1	3, 27	1	33.3	21.2 ± 6.2	1.7 ± 2.9	
80	847	10	Α	1	3, 27	1	10.9	34.4 ± 5.5	0 ± 0	
81	917	15	Α	1	1,30	1	44.7	16.7 ± 3.8	0 ± 0	
82	1014	10	А	1	0, 29	1	102	0 ± 0	0 ± 0	
83	1015	4	Α	1	0, 29	1	64.1	0 ± 0	1 ± 1.8	
84	1016	5	Α	1	0, 29	1	35.2	17.8 ± 2.3	0 ± 0	
85	1017	13	А	1	0, 29	1	27.5	11.6 ± 0.4	21.8 ± 2.3	
86	1018	8	А	1	0, 29	1	14.2	28.5 ± 0.6	0 ± 0	
87	1019	14	М	1	0, 29	1	22.1	24.3 ± 3.2	0 ± 0	
88	1020	8	AT	1	0, 29	1	20.8	42 ± 3	6.9 ± 7.2	
89	1021	4	М	1	0, 29	1	25.1	6.8 ± 5.9	22.2 ± 5.1	

Anexo 2	Origen de los	morfotipos biop	rospectados v si	ı cultivo i	(continuación)
	Ongoin de tos	monotipos biopi	103pcctau03 y 3t	Guttivo	(continuación)

Contoo	Morfotipo	poOrigen		Acerca del	Acerca del cultivo a escala pequeña			Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado‡	Envase **	Rendimiento del extracto†	A. bai	umannii	K. pneumoniae	
90	1022	1	М	1	0, 29	1	32.5	14.5 ± 2.2	0 ± 0	
91	1023	7	М	1	0, 29	1	45.2	1.3 ± 1.7	0 ± 0	
92	1024	12	AT	1	0, 29	1	158.3	$3.2 \pm 4.3$	1.2 ± 1.1	
93	1025	11	Α	1	0, 29	1	41.6	11.2 ± 6.5	0 ± 0	
94	1026	1	Α	1	0, 29	1	156.9	0 ± 0	0 ± 0	
95	1027	14	А	1	0, 29	1	35.2	14.3 ± 3	0 ± 0	
96	1028	6	М	1	0, 29	1	34.2	12.2 ± 1.8	0 ± 0	
97	1029	2	М	1	0, 29	1	69.2	39.7 ± 7.6	0 ± 0	
98	1030	13	Μ	1	0,29	1	20.5	26.9 ± 21.4	2.8 ± 4.9	
99	1031	11	Μ	1	0,29	1	44.8	22.2 ± 3.7	18.2 ± 16.8	
100	1033	16	Μ	1	0,29	1	36.6	41.6 ± 1	27.3 ± 1.6	
101	1035	10	М	1	0,23	1	72.6	13.9 ± 4.1	8 ± 8.4	
102	1036	6	Α	1	0,23	1	55	19.7 ± 7.7	1.3 ± 2	
103	1037	12	Α	1	0,23	1	42.2	25.5 ± 10.2	0 ± 0	
104	1038	7	Α	1	0,23	1	37.2	27.8 ± 11.1	5.4 ± 9.3	
105	1039	5	Μ	1	0,23	1	60.8	13.5 ± 4.7	0 ± 0	
106	1041	9	М	1	0,23	1	16	6.8 ± 8.6	$0.4 \pm 0.6$	
107	1042	16	Α	1	0,23	1	56.5	15.7 ± 9.6	0 ± 0	
108	1043	15	М	1	0,23	1	9.6	13.3 ± 8.3	0 ± 0	
109	1044	9	Α	1	0,23	1	105.2	16.2 ± 2.3	23.8 ± 3.7	
110	1045	10	Α	1	0,23	1	23.3	14.6 ± 1.6	2.2 ± 2.9	
111	1046	4	А	1	0,23	1	18.3	38.1 ± 6.4	0 ± 0	
112	1047	5	А	1	0, 23	1	21.2	16.3 ± 2.7	5.2 ± 5.1	
113	1049	8	А	1	0, 23	1	15.7	4.5 ± 5.8	1.4 ± 2.5	
114	1050	8	AT	1	0,23	1	21.2	29.2 ± 2.5	6.4 ± 11.1	
115	1052	1	М	1	0, 23	1	12.7	9.6 ± 1.8	0 ± 0	
116	1053	7	М	1	0, 23	1	35	0 ± 0	0 ± 0	
117	1054	12	AT	1	0, 23	1	74.1	20.9 ± 9	3.7 ± 3.3	
118	1055	11	Α	1	0, 23	1	15.1	12.1 ± 2.5	$0.3 \pm 0.5$	
119	1057	14	Α	1	0,23	1	25.3	14.7 ± 3	0 ± 0	

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Conteo	Morfotipo	Origen		Acerca del cultivo a escala pequeña			Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado*	Envase ***	Rendimiento del extracto†	A. bau	umannii	K. pneumoniae
120	1058	6	М	10, 2	23	1	15.4	26.3 ± 22.1	0 ± 0
121	1059	2	М	10, 2	23	1	37.2	35.3 ± 0.9	0 ± 0
122	1060	13	М	6, 2	3	1	31.5	27.8 ± 4.1	7.2 ± 6.9
123	1061	11	М	6, 2	3	1	19.3	33.1 ± 2.5	0 ± 0
124	1062	15	Α	6, 2	3	1	22.3	14.2 ± 1.7	3.1 ± 3.4
125	1063	16	М	6, 2	3	1	46	21.2 ± 4.9	0 ± 0
126	1064	10	М	6, 2	3	1	82.6	0.6 ± 1	0 ± 0
127	1065	6	Α	6, 2	3	1	27.1	10.7 ± 7.3	0 ± 0
128	1066	12	Α	6, 2	3	1	13.4	8.5 ± 7.4	$0.4 \pm 0.8$
129	1067	5	М	6, 2	3	1	23.4	20 ± 8	0 ± 0
130	1068	2	Α	6, 2	3	1	20.8	9.8 ± 10.3	0 ± 0
131	1069	9	М	6, 2	3	1	21.7	$0.3 \pm 0.5$	0 ± 0
132	1072	10	Α	6, 2	3	1	33.2	4.5 ± 7.8	0 ± 0
133	1073	4	Α	6, 2	3	1	26.4	11.4 ± 8.3	0 ± 0
134	1074	5	Α	6, 2	3	1	32.7	17.5 ± 4	0 ± 0
135	1075	13	Α	6, 2	3	1	21.1	4.7 ± 4.9	0 ± 0
136	1076	8	Α	6, 2	3	1	17.6	19.5 ± 4.5	0 ± 0
137	1077	8	AT	6, 2	3	1	14.4	1.8 ± 3.1	0 ± 0
138	1078	4	М	6, 2	3	1	37.8	24.9 ± 7.7	$3.8 \pm 3.4$
139	1079	1	М	6, 2	3	1	28.9	41.5 ± 6.3	18.4 ± 10.4
140	1080	12	AT	6, 2	3	1	21.5	0 ± 0	18.6 ± 2.3
141	1081	1	Α	6, 2	3	1	51.8	14.6 ± 12.8	0 ± 0
142	1082	14	А	6, 2	3	1	72.7	13.3 ± 1.9	0 ± 0
143	1083	6	М	6, 2	3	1	21	42.8 ± 7.9	2.8 ± 1.3
144	1084	2	М	6, 2	3	1	37.7	2.9 ± 5.1	5.7 ± 9.8
145	1085	13	М	13, 3	33	2	38	19 ± 1.1	8.1 ± 5.1
146	1086	16	М	13, 3	33	2	29.5	0 ± 0	0 ± 0
147	1087	10	М	13, 3	33	2	85.6	8.4 ± 4.7	4 ± 6
148	1088	6	А	13, 3	33	2	39.3	13.2 ± 3.1	0 ± 0
149	1090	5	М	13, 3	33	2	12.4	9.2 ± 8.5	22 ± 5.5

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Contoo	Morfotipo	Origen		Acerca del cultivo a e	Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡			
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado* Envase,	* Rendimiento del extracto†	A. ba	umannii	K. pneumoniae
150	1091	2	А	13, 33	2	34.2	7.3 ± 6.6	15.3 ± 14
151	1095	10	Α	13, 33	2	34.8	24 ± 5.1	29.1 ± 8.8
152	1097	5	Α	13, 33	2	18.3	16 ± 3.9	18.8 ± 5.1
153	1098	13	Α	13, 33	2	66.8	7.9 ± 10.9	13.6 ± 8.4
154	1099	8	Α	13, 33	2	10.4	0.7 ± 1.2	10.3 ± 2.9
155	1101	4	М	13, 33	2	23.2	46.6 ± 5.7	0 ± 0
156	1102	12	AT	13, 33	2	51.9	11 ± 1.4	0 ± 0
157	1103	1	Α	13, 33	2	46.6	56 ± 3.3	0 ± 0
158	1104	14	Α	13, 33	2	18	17.8 ± 7.5	23.5 ± 2.3
159	1106	2	М	13, 33	2	24.2	14 ± 5.4	10.8 ± 4.2
160	1108	16	М	13, 33	2	19.8	3.5 ± 3.2	$33 \pm 2.4$
161	1109	10	М	13, 33	2	22.4	11 ± 2.9	2.9 ± 4.9
162	1110	6	Α	13, 33	2	12.6	15.1 ± 3	22.3 ± 4.3
163	1111	12	А	13, 33	2	11.5	5.6 ± 4.2	1 ± 1.5
164	1112	5	М	13, 33	2	13.1	7.1 ± 4.5	19.8 ± 6.1
165	1113	2	Α	13, 33	2	24.3	19.1 ± 3.5	$32 \pm 4.3$
166	1114	9	М	13, 33	2	19.9	7.1 ± 4.6	32.1 ± 1.1
167	1115	16	Α	13, 33	2	60.3	5 ± 4.7	4.2 ± 7.2
168	1117	4	Α	13, 33	2	40.7	6.6 ± 3.2	0 ± 0
169	1118	5	Α	13, 33	2	53.3	0 ± 0	4.8 ± 4.3
170	1119	13	Α	13, 33	2	12.9	2.9 ± 4.3	11.7 ± 2.6
171	1120	8	Α	11, 33	1	48.9	39.4 ± 2.5	3.5 ± 3.4
172	1121	8	AT	11, 19	1	47.3	5.7 ± 5.5	3.4 ± 3.2
173	1124	1	Α	13, 33	2	36.4	31.3 ± 1	0 ± 0
174	1127	2	М	13, 33	2	42.8	18.8 ± 3	$0.2 \pm 0.4$
175	1128	13	М	13, 33	2	28.1	15.9 ± 2.8	8.1 ± 7.2
176	1129	16	М	13, 33	2	25.5	73.4 ± 3.2	31.8 ± 6.1
177	1130	10	М	13, 33	2	22.8	0 ± 0	$5 \pm 4.4$
178	1131	6	Α	13, 33	2	16.4	15.6 ± 0.4	29.9 ± 4.3
179	1132	12	А	13, 33	2	5	0 ± 0	0 ± 0

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Contoo	Morfotipo	tipoOrigen		Acerca del	Acerca del cultivo a escala pequeña			Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado*	Envase **	Rendimiento del extracto†	A. bai	umannii	K. pneumoniae	
180	1133	5	М	1	3, 33	2	5.2	13 ± 10.8	21.9 ± 2.2	
181	1180	6	Α	1	1,33	1	52.3	18.1 ± 4.5	1.9 ± 2.9	
182	1197	14	Н	1	0, 27	1	29.3	5.5 ± 4.4	0 ± 0	
183	1198	17	Н	1	0, 27	1	21.1	4 ± 5.7	0 ± 0	
184	1199	17	Н	1	0, 27	1	36	8 ± 4	0 ± 0	
185	1200	10	Н	1	0, 27	1	25.2	23.2 ± 5.8	0 ± 0	
186	1202	18	Н	1	0,27	1	37.5	0 ± 0	0 ± 0	
187	1203	10	Н	g	9, 33	1	82.3	1.5 ± 2.5	4.6 ± 6.5	
188	1204	9	Н	1	0,27	1	23.4	8.7 ± 1.3	0 ± 0	
189	1205	9	Н	1	0, 27	1	21.5	9.7 ± 4.8	0 ± 0	
190	1206	14	Н	1	1,33	1	35.1	21.2 ± 7.2	1.3 ± 2.2	
191	1208	8	Н	1	0,27	1	17.5	26 ± 10.2	0 ± 0	
192	1210	10	Н	1	0,27	1	33.1	7.7 ± 3	0 ± 0	
193	1211	10	Н	1	1,33	1	61.3	0 ± 0.1	33.1 ± 23.1	
194	1213	10	Н	1	1,33	1	15.7	5.3 ± 5.4	13.8 ± 8.6	
195	1215	10	Н	1	0,27	1	37	12.8 ± 1.3	0 ± 0	
196	1216	18	Н	1	0,27	1	23.5	14 ± 7.5	$0.4 \pm 0.7$	
197	1217	17	Н	1	0,27	1	60.5	7.5 ± 2	0 ± 0	
198	1218	14	Н	1	0,27	1	33.5	7.9 ± 6.6	0 ± 0	
199	1219	10	Н	1	0,27	1	36.2	2.6 ± 3.3	0 ± 0	
200	1220	14	Н	1	0,27	1	19.4	7.7 ± 4.3	0 ± 0	
201	1221	10	Н	1	0,27	1	59.3	4.8 ± 2	1 ± 1.3	
202	1222	10	Н	1	0,27	1	53	4.2 ± 1.6	0 ± 0	
203	1223	18	Н	1	0,27	1	70.1	0 ± 0	0 ± 0	
204	1224	18	Н	1	0,27	1	70.6	11.3 ± 1.8	4.6 ± 8	
205	1253	3	Μ	1	2,34	1	8.9	2.8 ± 4.8	0 ± 0	
206	1254	14	Т	1	2,34	1	38.3	0 ± 0	0 ± 0	
207	1255	3	А	1	2,34	1	37.4	4.6 ± 3.3	0.1 ± 0.2	
208	1256	5	М	1	2,34	1	9.8	22.3 ± 6	9.5 ± 8.6	
209	1258	9	М	1	2,34	1	13.8	$6.3 \pm 6.4$	30.3 ± 1.1	

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Contoo	Morfotipo	Origen		Acerca del cultivo a es	Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡			
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado* Envase*	* Rendimiento * del extracto†	A. ba	umannii	K. pneumoniae
210	1259	16	Α	12, 34	1	23.8	13.9 ± 0.6	7.8 ± 6.9
211	1260	17	Α	12, 34	1	22.1	0 ± 0	8.4 ± 3.1
212	1261	15	М	12, 34	1	10.4	0 ± 0	$5.4 \pm 5.4$
213	1262	9	А	12, 34	1	16.3	3 ± 3.9	12.9 ± 3.4
214	1263	10	А	12, 34	1	52	26.3 ± 0.7	9.4 ± 2.5
215	1265	17	Т	12, 34	1	8.7	0 ± 0	0 ± 0
216	1266	5	Α	12, 34	1	17.8	13.1 ± 5.7	10.4 ± 1.8
217	1268	8	Α	12, 34	1	32.2	15.2 ± 5.9	0 ± 0
218	1269	14	М	12, 34	1	12.5	14.9 ± 3	2.7 ± 2.8
219	1271	4	М	12, 34	1	29.4	4.4 ± 2.7	$0.2 \pm 0.4$
220	1272	1	М	12, 34	1	22.8	0 ± 0	14.1 ± 8
221	1273	7	М	12, 34	1	15.7	0 ± 0	13.5 ± 10.8
222	1274	12	AT	12, 34	1	22.8	44.7 ± 11.4	34.7 ± 5.7
223	1275	11	А	12, 34	1	14	0 ± 0	27.9 ± 5.8
224	1276	1	Α	12, 34	1	16.7	15.7 ± 9.7	$2.6 \pm 4.4$
225	1277	14	А	12, 34	1	19.2	9 ± 3.5	21.7 ± 1.7
226	1278	6	М	12, 34	1	19.8	0.9 ± 1.6	4.1 ± 1.5
227	1279	2	М	12, 34	1	20.3	4.2 ± 4.2	24.2 ± 1
228	1280	13	М	12, 34	1	49.1	0 ± 0	8.8 ± 7.9
229	1282	15	Α	12, 34	1	13.8	5.3 ± 3	23.4 ± 4.9
230	1284	17	М	11, 33	1	20.8	17.2 ± 6.3	9.6 ± 10
231	1290	3	Α	11, 33	1	20.3	1.5 ± 2.6	0.5 ± 0.8
232	1292	2	Α	11, 33	1	27.9	8.8 ± 2.3	0 ± 0
233	1296	9	Α	11, 33	1	42	3.2 ± 3.1	0 ± 0
234	1299	17	Т	11, 25	1	2.9	1.7 ± 3	2.5 ± 2.3
235	1303	14	М	11, 33	1	16.7	3.1 ± 2.7	$0.5 \pm 0.9$
236	1309	11	А	11, 33	1	43.9	0 ± 0	22.3 ± 3.4
237	1322	7	А	11, 33	1	33.7	10.9 ± 9.4	$24.6 \pm 2.4$
238	1426	17	М	11, 33	1	6.4	8.8 ± 12.2	8.9 ± 3.1
239	1435	5	А	11, 25	1	27.9	8.9 ± 2.2	7.4 ± 8.9

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Conteo	Morfotipo	Origer	Origen		cultivo a esc	ala pequeña	Inhibic (m	Inhibición del crecimiento bacteriano en % (media ± desviación estándar)‡		
Conteo	(IQ-)	Hormiga y nido	Sitio*	Días incubado*	Envase**	Rendimient del extracto	A. bau	umannii	K. pneumoniae	
240	1436	8	А	1	1,33	1	72.6	10.5 ± 3	1.1 ± 1.3	
241	1438	1	М	1	1,33	1	17.2	6.1 ± 5.8	1.3 ± 2.2	
242	1453	7	А	1	1,33	1	22.4	0 ± 0	0 ± 0	
243	1456	15	М	1	1,33	1	19.8	0 ± 0	3.5 ± 3.2	
244	1464	15	М	1	1,33	1	36.4	$0.4 \pm 0.7$	$2.6 \pm 4.6$	
245	1479	17	Н	1	1,33	1	84.2	4.1 ± 7.1	0 ± 0	
246	1480	10	Н	1	1,33	1	41.8	9.4 ± 4.3	1.8 ± 2.9	
247	1487	9	А	1	1,33	1	38	20.9 ± 7.9	0 ± 0	
248	1505	5	М	1	1,25	1	37.3	2.8 ± 4.8	12 ± 10.5	
249	1539	17	А		28	3	3.8	0 ± 0	10.4 ± 10.0	
250	1544	14	М		31	3	2.4	0 ± 0	7.5 ± 7.9	
251	1545	10	М		31	3	234.8	7.3 ± 1.5	$0.2 \pm 0.3$	
252	1546	5	М		31	3	80.0	0 ± 0	0 ± 0	
Contro	l del medio de	e crecimiento s	ólido1	10.	9 ± 2.2 2	28.4 ± 4.4	46.8 ± 35.3	3.3 ± 2.5	$4.8 \pm 6.6$	
Contro	l del medio de	e crecimiento l	íquido		30	3	6.2	2.0 ± 3.5	0 ± 0	
Gei	ntamicina en	DMSO a 8 µg/n	nL		-	-	-	ND	99.2 ± 1.2	
Ge	ntamicina en	agua a 64 µg/n	nL		-	-	-	22.7 ± 1.6	ND	
С	olistina en ag	jua a 20 µg/ mL	-		-	-	-	98.0 ± 0.4	ND	
Control negativo					-	-	-	1.5 ± 0.9	2.1 ± 1.8	
Control de esterilidad					-	-	-	100.0 ± 0.4	$100.0 \pm 0.1$	

Anexo 2. Origen de los morfotipos bioprospectados y su cultivo (continuación)

Del numeral 1 al 248 se listan los hongos filamentosos y del 249 al 252 los mucoides.

\* El origen posible es montículo (M), alrededores (A), túnel (T), área de tránsito (AT) u hormiga (H).

\* Primer periodo en caldo PD y segundo en cereal para los hongos filamentosos. Tiempo total en caldo PD para los hongos mucoides.

\*\* Matraz de vidrio de 25 mL (1), tubo plástico de 50 mL (2) o matraz de vidrio de 250 mL (3).

† El rendimiento se calculó en mg de extracto por cada gramo de cereal que se inoculó o mg de extracto por litro de medio de cultivo PD.

‡ De cada muestra se reporta el promedio de al menos tres réplicas y su desviación estándar. Salvo que se indique de otra forma las muestras se evaluaron disueltas en DMSO a una concentración final de 250 μg/mL.

<sup>1</sup> Se reporta el promedio y la desviación estándar de 12 cultivos independientes, 9 envasados en matraces y 3 en tubos plásticos. ND: no determinado. Anexo 3. Región ITS del ADN ribosómico de los morfotipos seleccionados

### • Trichoderma sp. cepa IQ-819, 583 pb, número de GenBank PQ895538

#### • Clonostachys sp. cepa IQ-814, 541 pb, número de GenBank PQ895540

### • Cladosporium sp. cepa IQ-807, 524 pb, número de GenBank PQ895539



Anexo 4. Vistas microscópicas de los morfotipos

Imágenes de microscopía óptica con un aumento de 1000X, de tinciones con azul de lactofenol de las cepas IQ-1129 (A), IQ-1038 (B) e IQ-1017 (C) cultivas en agar PD. En todos los casos se observan conidios y conidióforos propios de ascomicetos.

Nodo	Compuesto identificado y formula molecular*	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Aducto*	Error de masa (ppm)*	Coseno de similitud *	Fragmentos *	Morfotipo asociado*	Tiempo de retención (min)*	Masa exacta teórica	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Error de masa (ppm)**	Diferencia de masa **
28151	Versiconol ( <b>56</b> )	361.092	[M+H]⁺	0.0	0.8908	5	IQ-776	3.64	361.0923	361.0925	-0.6	-0.0002
28151	$C_{18}H_{16}O_8$						IQ-776	3.57	361.0923	361.0925	-0.6	-0.0002
29122	Asperversiamida F ( <b>64</b> )	434.244	[M+H]⁺	0.0	0.9665	11	IQ-1223	5.47	434.2443	434.2439	0.9	0.0004
29122	$C_{26}H_{31}N_3O_3$						IQ-1223	5.39	434.2443	434.2439	0.9	0.0004
30927	Triterpenoide ( <b>62</b> )	676.443	[M+H]⁺	1.4	0.8909	8	IQ-839	4.87	676.4424	676.4431	-1.0	-0.0007
30927	$C_{38}H_{61}NO_9$						IQ-839	4.79	676.4424	676.4431	-1.0	-0.0007
31807	SCH 60059 ( <b>63</b> )	917.690	[M+H]⁺	2.2	0.7920	32	IQ-1029	4.59	917.6929	917.6896	3.6	0.0033
31807	$C_{51}H_{96}O_{13}$						IQ-1029	4.65	917.6929	917.6896	3.6	0.0033
31807		000 400		0.0	0 7700	~	IQ-1029	4.72	917.6929	917.6896	3.6	0.0033
28170	Secosterigmatocistina (55)	363.106	[M+H]⁺	2.8	0.7738	/	IQ-776	2.77	363.1079	363.1061	5.0	0.0018
28170	$C_{18}H_{18}O_8$						IQ-776	2.84	363.1079	363.1061	5.0	0.0018
28170		201 096		2 5	0 0000	0	IQ-776	2.90	303.1079	363.1061	5.0	0.0018
20077		291.000	[M+H]⁺	3.5	0.0009	9	IQ-1109	3.44	291.0000	291.0800	2.7	0.0008
20077							IQ-1109	3.67	201.0000	291.0800	2.7	0.0008
26677	Fonsecina ( <b>65</b> )						IQ-1109	3 58	291.0000	291.0860	2.7	0.0008
26677	$C_{15}H_{14}O_{6}$						IQ-1109	3.79	291.0868	291.0860	2.7	0.0008
26677							IQ-1109	3.51	291.0868	291.0860	2.7	0.0008
26677							IO-1109	3.71	291.0868	291.0860	2.7	0.0008
29981		520.235	[M+H]+	3.9	0.8852	14	IQ-1278	3.86	520.2335	520.2355	-3.8	-0.002
29981	Oxalicina B ( <b>57</b> )		[[.].1]				IQ-1278	3.71	520.2335	520.2355	-3.8	-0.002
29981	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>						IQ-1278	3.78	520.2335	520.2355	-3.8	-0.002
29981							IQ-1278	3.64	520.2335	520.2355	-3.8	-0.002
29820	Oxalicina B ( <b>57</b> )	502.224	[M-	4.0	0.9523	9	IQ-1278	3.73	502.2229	502.2243	-2.8	-0.0014
29820	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>		H2O+H]⁺				IQ-1278	3.66	502.2229	502.2243	-2.8	-0.0014
29400		461.215	[M+H]+	4.4	0.7028	14	IQ-767	4.46	461.2175	461.2154	4.6	0.0021
29400	Derivado de austalida J (68)		[]				IQ-767	4.39	461.2175	461.2154	4.6	0.0021
29400	$C_{25}H_{32}U_8$						IQ-767	4.32	461.2175	461.2154	4.6	0.0021
29408	Azafilona ( <b>60</b> )	462.170	[M+H]+	4.4	0.8943	14	IQ-822	6.13	462.1683	462.1697	-3.0	-0.0014
29408	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> ClNO <sub>6</sub>		r 1				IQ-822	6.07	462.1683	462.1697	-3.0	-0.0014

Anexo 5. Información sobre las identificaciones promisorias de los nodos

Nodo	Compuesto identificado y formula molecular*	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Aducto*	Error de masa (ppm)*	Coseno de similitud *	Fragmentos *	Morfotipo asociado*	Tiempo de retención (min)*	Masa exacta teórica	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Error de masa (ppm)**	Diferencia de masa **
24470	$\mathbf{B}_{\mathbf{V}}$	209.082	[M+H]⁺	4.8	0.7001	7	IQ-1022	2.43	209.0813	209.0816	-1.4	-0.0003
24470							IQ-1022	2.52	209.0813	209.0816	-1.4	-0.0003
24470	01111204						IQ-1022	2.38	209.0813	209.0816	-1.4	-0.0003
28790	Deacetilcloronectrina ( <b>58</b> )	405.184	[M- H2O+H]⁺	4.9	0.9065	12	IQ-777	7.95	405.1832	405.1838	-1.5	-0.0006
28790	CooHorciOc						IQ-777	7.15	405.1832	405.1838	-1.5	-0.0006
28790	02311310105						IQ-777	8.29	405.1832	405.1838	-1.5	-0.0006
28294	LL-Ζ 1272 ε ( <b>59</b> )	373.239	[M+H]⁺	5.4	0.9821	10	IQ-777	6.93	373.2378	373.2387	-2.4	-0.0009
28294	$C_{23}H_{32}O_4$						IQ-777	7.00	373.2378	373.2387	-2.4	-0.0009
28039		355.155	[M-	5.6	0.9653	11	IQ-1505	6.59	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039			- H2O+H]⁺				IQ-1505	5.58	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039			-				IQ-1505	6.54	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039							IQ-1505	5.65	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039							IQ-1505	5.52	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039							IQ-1505	5.45	355.1545	355.1563	-5.1	-0.0018
28039	9 9 9 Vermixocina A ( <b>67</b> ) 9 C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> 9 9						IQ-1022	5.54	355.1545	355.1542	0.8	0.0003
28039							IQ-1022	6.61	355.1545	355.1542	0.8	0.0003
28039							IQ-1266	5.46	355.1545	355.1561	-4.5	-0.0016
28039							IQ-1266	6.53	355.1545	355.1561	-4.5	-0.0016
28039							IQ-1266	5.59	355.1545	355.1561	-4.5	-0.0016
28039							IQ-1266	6.60	355.1545	355.1561	-4.5	-0.0016
28039							IQ-1266	5.53	355.1545	355.1561	-4.5	-0.0016
28039							IQ-1088	5.65	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28039							IQ-1088	5.92	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28039							IQ-1088	6.61	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28039							IQ-1088	5.59	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28039							IQ-1088	6.68	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28039							IQ-1088	5.52	355.1545	355.1527	5.1	0.0018
28014	1, 2, Dobidroponicillida (CC)	353.140	[M-	5.7	0.7758	8	IQ-1505	4.91	353.1389	353.1402	-3.7	-0.0013
28014			H2O+H1⁺				IQ-1505	4.85	353.1389	353.1402	-3.7	-0.0013
28014	$C_{21}\Pi_{22}U_6$		]				IQ-1266	4.86	353.1389	353.1401	-3.4	-0.0012

Anexo 5. Información sobre las identificaciones promisorias de los nodos (continuación)

#### Anexo 5. Información sobre las identificaciones promisorias de los nodos (continuación)

Nodo	Compuesto identificado y formula molecular*	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Aducto*	Error de masa (ppm)*	Coseno de similitud *	Fragmentos *	Morfotipo asociado*	Tiempo de retención (min)*	Masa exacta teórica	lon precursor ( <i>m/z</i> )*	Error de masa (ppm)***	Diferencia de masa **
29670		487.199	[M+H]⁺	6.1	0.8874	12	IQ-843	4.80	487.1968	487.1985	-3.5	-0.0017
29670	Policétido cíclico ( <b>61</b> )		[···]				IQ-843	5.25	487.1968	487.1985	-3.5	-0.0017
29670	$C_{26}H_{30}O_{9}$						IQ-821	4.80	487.1968	487.1991	-4.7	-0.0023
29670							IQ-821	5.26	487.1968	487.1991	-4.7	-0.0023

\* De acuerdo con el comparativo del espectro consenso del nodo con la librería de GNPS.

\* Extraído del TIC de cada extracto.

 $^*_{**}$  Información calculada a partir de los datos del TIC.

Nomenclatura IUPAC de los compuestos sin nombre común:

62. Ácido 10-((3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-5-hidroxi-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-

1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahidropiceno-4a(2H)-carboxílico.

**68**. 5a,6-dihidroxi-13-metoxi-5,5,7a,9,14b-pentametil-1,2,5a,6,7,7a,10,14,14a,14b-decahidro-5H-furo[3,4-i]oxepino[4,3-a]xanteno-3,12-diona.

**60**. Ácido 2-(7-acetoxi-5-cloro-3-((1E,3E)-3,5-dimetilhepta-1,3-dien-1-il)-7-metil-6,8-dioxo-7,8-dihidroisoquinolin-2(6H)-il)propanoico.

61. 2-((1E,3E)-hexa-1,3-dien-1-yl)-5-metoxi-2-metil-4-(1,7,8-trihidroxi-6-metoxi-1,3-dimetil-4-oxo-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-2-carbonil)furan-3(2H)-ona.



### Anexo 6. Fraccionamiento del control del medio de crecimiento sólido

Anexo 7. Fraccionamiento secundario de la cepa IQ-819, IQ-814 e IQ-807

## • Trichoderma sp. cepa IQ-819

La fracción primaria de mediana polaridad (MeCN-MeOH 8:2) se abosrbió en celita-gel de sílice y se fraccionó por cromatografía raída en fase reversa. Se empleó un sistema de elución a 10 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 10 min, 5:95→61:39 en 8.4 min, 61:39→80:20 en 6.6 min, 80:20→88:12 en 1.3 min, 88:12→91:9 en 0.2 min, 91:9→91:9 durante 5.7 min y 91:9→100:0 en 0.8 min, que finalizó con un lavado con MeCN y MeOH 5:95→5:95 durante 0.5 min, 5:95→0:100 en 1.1 min y 100% de MeOH por 15 min.

## • Clonostachys sp. cepa IQ-814

La fracción primaria de mediana polaridad (MeCN-MeOH 8:2) se absorbió en celita-gel de sílice y se fraccionó por cromatografía raída en fase reversa. Se empleó un sistema de elución a 10 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 12 min, 5:95→54:46 en 10.1 min, 54:46→100:0 en 3.6 min, 100:0→100:0 durante 30 min, un cambio de 100% MeCN a 100% MeOH en 1 min y un lavado con MeOH durante 42 min.

## • Cladosporium sp. cepa IQ-807

La fracción primaria de mediana polaridad (MeCN-MeOH 8:2) absorbió en celita-gel de sílice y se fraccionó por cromatografía raída en fase reversa. Se empleó un sistema de elución a 10 mL/min consistente en un gradiente de MeCN y agua ácida 5:95→5:95 durante 12 min, 5:95→32:68 en 4.8 min, 32:68→65:35 en 11.4 min, 65:35→65:35 durante 11 min, 65:35→80:20 en 2.6 min, 80:20→80:20 durante 11 min y 80:20→100:0 en 1.7 min, que finalizó con un lavado con MeCN por 12 min y MeOH por 20 min.



Anexo 8. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-1129



Anexo 9. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-1038



Anexo 10. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-819



Anexo 11. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-814



Anexo 12. Fraccionamiento del extracto de la cepa IQ-807































Anexo 37. Espectro COSY (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 49












Anexo 47. Espectro HRMS-ESI+-QTOF de 52







Anexo 49. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 52

















Compuestos aislados por morfotipo	Inhibición en % (media ± desviación	Concentración (mM)
	estándar)	
IQ-1129		
PF1140 ( <b>44</b> )	ND	0.36
Deoxi-PF1140 ( <b>45</b> )	ND	0.38
IQ-1038		
Ácido penicílico ( <b>46</b> )	ND	0.59
IQ-1017		
Brefeldina A ( <b>47</b> )	0	0.36
IQ-819		
Ácido tricodérmico ( <b>48</b> )	0	0.33
Ácido tricodérmico A ( <b>49</b> )	0	0.31
Ácido tricodérmico C ( <b>50</b> )	0	0.31
Tricodermamida A ( <b>51</b> )	0	0.23
IQ-814		
( <i>E</i> )-tridec-7-eno-3,5,6,10-tetraol ( <b>52</b> )	0	0.44
IQ-807		
<i>iso</i> -Cladospolida B ( <b>53</b> )	0	0.44
*Colistina en agua a 20 µg/ mL	97.4 ± 2.79	0.02
*Gentamicina en agua a 64 µg/ mL	42.9 ± 12.9	0.11
Control negativo	0	_
Control de esterilidad	100 ± 0.0	-

Anexo 58. Inhibición de la formación de biopelícula de A. baumannii cepa A564

Determinaciones realizadas al menos por quintuplicado, se reporta la media y su desviación estándar. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se evaluaron a una concentración final de 100 µg/mL. ND: no determinado. \*Controles positivos.



Anexo 59. Comprobantes de participación en simposios y congresos

Bioprospección de hongos filamentosos aislados de hormigas y sus nidos, provenientes de Veracruz, México A. S. Aguilar-Colorado, J. E. Valenzuela-González, E. Tapia-Mendoza & J. Rivera-Chávez 6 - 7 y 13 - 14 de mayo de 2023

-H

TORONTO

m

GEHN

Dereele

Daniela Cubillos

GEHN

UFPR

María C. To

GEHN

o Fiorenting

GEHN

M Unc

Diana M. Urcuqui Rojas

GEHN

a Velás

GEHI

iqui Rojas

FUEDEI

# Antibacterial compounds from fungi associated with ant nests

Ángel Sahid Aguilar-Colorado<sup>1</sup>, Jorge Ernesto Valenzuela-González<sup>2</sup>, Everardo Tapia-Mendoza<sup>3</sup> and José Alberto Rivera-Chávez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México. <sup>2</sup>Red de Ecología Funcional, Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México. <sup>3</sup>LANCIC, Instituto de Química, UNAM, México. email: ssahi@comunidad.unam.mx, jrivera@iquímica.unam.mx



#### INTRODUCTION

Drug-resistant bacteria are one of the world's greatest health threats, capable of generating difficult-to-treat, sometimes lethal infections.<sup>1</sup> In response, fungal diversity and its chemical space can be used to find new antibiotics.<sup>2,3</sup> We proposed that the fungi associated with anthills of cloud forest are a latent source of antibacterials.<sup>4</sup>



Ants and their nest

Cloud forest in Mexico

#### METHODS

Fungi and compounds

Extracts were obtained by fermentation in wheat cereal from a collection of 248 microscopic fungi isolated from ants and nests collected in a cloud forest in Veracruz, Mexico, in 2020 were screened for their ability to inhibit *in vitro* the growth of the Gram-negative multidrug-resistant bacteria. Untargeted spectrometric metabolomics analysis (HRMS-ESI-QTOF) of the extracts allowed the visualization of the chemical space under study in molecular and bioactive networks allowing fungi prioritization. The chemical study is under development.



#### **RESULTS AND DISCUSSION**

Specimens of six ants were collected, samples from 19 nests and 17 from the surrounding terrain. The species are:

Solenopsis geminata Atta mexicana Dorymyrmex bicolor Nomamyrmex esenbeckii Cheliomyrmex morosus Camponotus sericeiventris



The collection contains 686 viable axenic morphotypes, as show below. Its extract was obtained from a sample of 246 fungi.



In the inhibition assay the collection performed better against *A. baumannii* compared to *K. pneumoniae*.



The chemical diversity of the fungi was visualized in molecular networks\*. Fungi associated with ants represent a smaller chemical space, but rich in derivatives. 17 compounds were dereplicated.



The predicted bioactive components are analyzed in another network\*\*:



\*\*The square nodes are the fungi, linked to each other by edges through the potentially bloactive m/z (MS1) they share (represented by circular nodes).

#### CONCLUSIONS

Bioprospecting study support the proposal that the chemical composition of multicellular fungi from ants and their nests are a source of compounds antibacterial, but the isolation of compounds is under development. Metabolic analysis reassesses the chemistry of soil fungi for other purposes and avoid redundant isolation of molecules.

#### FUNDING

Thanks are due to Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías for funding grant 885837 and for project CF-2019-263977, as well as to UNAM for funding project IA207422 and IA203220.

#### REFERENCES

1. Murray, C. J. et al. The Lancet 2022, 399 (10325), 629–655. 2. Moloney, M. G. Trends Pharmacol Sci 2016, 37 (8), 689–701. 3. González-Medina, M. et al. 2017, Front Pharmacol 8:180. 4. Aguilar-Colorado, A. S. and Rivera-Chávez, J. Rev. Bras. Pharmacog. 2023. https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3.





# Los actinomicetos: el laboratorio químico de las hormigas

Ángel Sahid Aguilar Colorado y José Alberto Rivera Chávez

Los actinomicetos o actinobacterias son organismos microscópicos ampliamente distribuidos en el entorno: ambientes acuáticos y terrestres no escapan a su colonización.

Los actinomicetos viven sobre plantas, hongos, protozoos y animales. Cuando los observamos al microscopio vemos su forma de filamentos ramificados, muy parecidos a como se ve una raíz desordenada, por lo que su nombre se deriva del griego *aktino*, que significa "rayo".

Para los seres humanos, los actinomicetos son una fuente prolífica de medicamentos, incluyendo antibióticos y antitumorales.

Por ejemplo, del actinomiceto *Streptomyces sp.* proviene la estreptomicina, un antibacteriano de distribución comercial, y también la doxorrubicina, un fármaco muy usado en quimioterapia.

Pero no solo el *Homo sapiens* ha aprovechado la biosíntesis que realizan los actinomicetos; también otras especies, insectos principalmente, han desarrollado esta capacidad a través de millones de años, gracias a la evolución.

El papel de ciertos actinomicetos como fábricas de compuestos químicos y cómo éstos son aprovechados por algunos insectos e inclusive crustáceos ha sido bien documentado. De estos ejemplos destaca la cooperación entre los actinomicetos y ciertas especies de hormigas que se ha estudiado ampliamente desde el punto de vista químico.

Las hormigas Atta sp. y Acromyrmex sp. son conocidas por cultivar dentro de sus nidos un hongo del género *Leucoagaricus*, al que proveen con trozos de hojas frescas, pues con ese hongo alimentan a sus larvas. Pero esta relación de beneficio mutuo se ve amenazada por el ataque de patógenos como el hongo oportunista *Escovopsis sp.*, cuya invasión es capaz de acabar con el hormiguero.

Aunque las hormigas cuentan con mecanismos que las protegen contra infecciones, como las secreciones de sus glándulas metapleurales, se ha descubierto que actinomicetos del género *Pseudonocardia* y *Streptomyces* colaboran con las hormigas y su hongo simbionte sintetizando antibióticos, los cuales, por cierto, resultan muy complejos de sintetizar en un laboratorio.

Estos antifúngicos y antibacterianos son, en su mayoría, moléculas orgánicas cíclicas de naturaleza peptídica, es decir, que contienen aminoácidos, algunas veces ligeramente modificados: tales como la dentigerumicina, uno de los primeros mediadores químicos descritos en la literatura capaces de detener el desarrollo de *Escovopsis sp*. También se han descrito otros compuestos similares a la dentigerumicina, entre los que destacan las gerumicinas, valinomicinas, antimicinas, actinomicinas, candicidinas y también otros distintos como las pseudonocardonas, o incluso moléculas crípticas, es decir, aquellas difíciles de hallar, como la 9-metoxirebecamicina, que se asume podría tener propiedades anticancerígenas, por ser muy cercana en identidad química a un tratamiento de ese tipo que se estudia actualmente.

Las hormigas que se sirven de los actinomicetos, los cargan sobre su cuerpo, en la cutícula, o en una bolsa en su boca, pues así les proveen nutrientes para sobrevivir y se completa un intercambio metabólico que es benéfico para ambos organismos.

Además, cuando los actinomicetos están sobre el cuerpo de las hormigas y estas transitan por los túneles y cámaras del hormiguero, logran distribuirlos por su nido. Por el contrario, cuando están en la boca de las hormigas, contribuyen a consumir las partes enfermas del jardín de *Leucoagaricus sp.*, atacadas por *Escovopsis* sp. Y al mezclarlas con los péptidos que producen se detiene la infección por *Escovopsis* sp. Así las hormigas, con ayuda de los actinomicetos, preservan la sanidad del hormiguero. Esta simbiosis bacteriana que existe en las hormigas recolectoras de hojas, ha suscitado interés en encontrar este fenómeno en otras especies de hormigas e identificar las moléculas que intervienen en esos casos.

Para nosotros, los seres humanos, esas moléculas son de interés, pues podrían contribuir al desarrollo de tratamientos para enfermedades provocadas por hongos filamentosos, levaduras y protozoarios, tales como la malaria y la leishmaniasis; y además ayudar a combatir infecciones bacterianas, sobre todo aquellas resistentes a fármacos convencionales.



#### **REFERENCIAS:**

Oh, D. C.; Poulsen, M.; Currie, C. R.; Clardy, J. Dentigerumycin: A Bacterial Mediator of an Ant-Fungus Symbiosis. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (6), 391–393. https://doi.org/10.1038/nchembio.159

Phelan, V. V.; Liu, W. T.; Pogliano, K.; Dorrestein, P. C. Microbial Metabolic Exchangeg-the Chemotype-to-Phenotype Link. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8 (1), 26–35. https://doi.org/10.1038/nchembio.739

Ramadhar, T. R.; Beemelmanns, C.; Currie, C. R.; Clardy, J. Bacterial Symbionts in Agricultural Systems Provide a Strategic Source for Antibiotic Discovery. *J. Antibiot.* (Tokyo). **2014**, 67 (1), 53–58 https://doi.org/10.1038/ja.**2013**.77.

Van der Meij, A.; Worsley, S. F.; Hutchings, M. I.; van Wezel, G. P. Chemical Ecology of Antibiotic Production by Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, 41 (3), 392–416. https://doi.org/10.1093/femsre/fux005

Heine, D.; Holmes, N. A.; Worsley, S. F.; Santos, A. C. A.; Innocent, T. M.; Scherlach, K.; Patrick, E. H.; Yu, D. W.; Murrell, J. C.; Vieria, P. C.; Boomsma, J. J.; Hertweck, C.; Hutchings, M. I.; Wilkinson, B. Chemical Warfare between Leafcutter Ant Symbionts and a Co-Evolved Pathogen. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1

#### REVIEW



# Ants/Nest-Associated Fungi and Their Specialized Metabolites: Taxonomy, Chemistry, and Bioactivity

Ángel Sahid Aguilar-Colorado<sup>1</sup> · José Rivera-Chávez<sup>1</sup>

Received: 13 February 2023 / Accepted: 9 June 2023 / Published online: 17 July 2023 © The Author(s) 2023

## Abstract

Microscopic fungi occupy a vast number of habitats, are taxonomically diverse, degrade complex substrates, and have stood out for their capacity to biosynthesize a plethora of specialized metabolites. Such molecules are structurally diverse, and many have applications in fundamental and applied sciences, for example, in medicine, material sciences, food chemistry, textile and pharmaceutical industries, and agronomy, among other fields. However, despite the tremendous biotechnological value of fungi, these organisms are understudied, limiting the knowledge to their taxonomy, chemistry, and some putative applications. Notably, some specific habitats remain unexplored in terms of their mycobiota. Based on these considerations, this review describes the known fungal diversity associated with ants/nests, their metabolic potential, and the possible applications of their specialized metabolites in drug discovery programs focused on developing treatments for human diseases. According to this revision, fungal diversity has been studied by applying conventional methodologies such as isolation and morphological identification of soil fungi from mounds and nest chambers, and indirectly from ants' cuticles and glands. The subfamilies, genera, taxonomical information, and geographical origin of ants from which filamentous fungi and yeast are commonly isolated are also described. Furthermore, some important information is presented concerning the difference between the ant-associated mycobiota and that in the surroundings, discarding the extrapolation of the chemical and biological information known for soil fungi. Altogether, this review evidenced the lack of information regarding the chemical composition of ant-associated fungi, encouraging research focused on exploring the chemistry biosynthesized from ants' mycobiota, as well as the elucidation of their allelopathic potential inside the nests.

Keywords Ant · Anthill-associated fungi · Antibacterial · Antidiabetic · Antifungal · Bioprospecting · Mycobiota

# Introduction

Since ancient times, fungi have been used by humankind as food and through bioprocesses to produce beer and wine (Ghorai et al. 2009). Currently, technological advances have allowed the development of several biotechnological areas, for example, biocontrol, bioremediation, biomass degradation, biofuel, organic acids, enzymes, agrochemical, and pharmaceutical production industries, to name but a few (Berasategui et al. 2016; Meena and Siddhardha 2019; Hyde et al. 2019). The fungi occupy a vast number of habitats, are taxonomically diverse, degrade complex substrates, and have stood out for their capacity to biosynthesize a plethora of specialized metabolites. Moreover, such molecules are structurally diverse, and many have applications in fundamental and applied sciences, for example, in medicine, material sciences, food chemistry, textile and pharmaceutical industries, and agronomy, among other fields (Schueffler and Anke 2014; González-Medina et al. 2016, 2017; Aldholmi et al. 2019). However, despite recent technological advances and the high biotechnological value of fungi, these organisms are understudied, and specific habitats remain unexplored. In this regard, the chemical constituents of a small number of species are known, and consequently, the use of their chemical heritage is limited (Schueffler and Anke 2014; Chassagne et al. 2019; Pham et al. 2019).

Given their biological diversity and cosmopolitan presence, fungi are the second most diverse kingdom on Earth, bringing together among 2.2–3.8 million species. However, so far, just over 200,000 have been described

José Rivera-Chávez jrivera@iquimica.unam.mx

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, 04510 Ciudad de México, Mexico

(Hawksworth and Lücking 2017). Macroscopic fungi are recognized due to their fruiting bodies; nevertheless, a considerable part of the biodiversity is composed of those with microscopic reproductive structures. Microscopic fungi are further divided into yeasts and filamentous fungi, and multicellular and unicellular eukaryotic organisms, respectively (De-Wei 2016). Consequently, the study through bioprospecting projects of areas with unknown mycobiota can lead to the description of new species and valuable chemical-biological information about the microorganisms and the specialized molecule produced. Some of these underexplored habitats are the ants' nests, whose importance from the chemical-pharmaceutical point of view was evidenced by the study of their bacteriobiota, which have led to the discovery of various antifungals, for example, the cyclic depsipeptide dentigerumycin (1), involved in interspecific interactions among ants of the Attini tribe and the mycobiota of their nests (Oh et al. 2009; Pathak et al. 2019; Agarwal et al. 2022). The importance of microbiota associated with the nests and materials of other arthropods such as termites (Bignell et al. 1991; Yan et al. 2011; Chen et al. 2022), bees (Poulsen et al. 2011; Madden et al. 2013; Promnuan et al. 2021), and spiders (Iwai et al. 2009) has also been explored.



Based on these considerations, this review describes the known fungal diversity associated with ants of various species widely distributed globally, their nest, and the metabolic potential of isolated taxa, as well as the possible applications of their specialized metabolites. In a complementary way to some previous works, this compilation provides information concerning the variety of ant species from which fungi have been isolated and chemically studied. Additionally, the mycobiota of the nests is compared with that of the surroundings. However, a similar work highlighting the study of yeast diversity in several ants of the *Attini* tribe was published (Bizarria et al. 2022). Analysis of the retrieved information shows that literature on fungal diversity associated with nest focuses on the mounds and chambers of a few ant species, mainly the so-called leafcutters, generally distributed in South and North America (Fig. 1). Likewise, the most common ants/nest-associated fungal genera are listed, highlighting the underrepresented ones for their bioactivity. Although the chemical composition of ants/nest-associated fungi remains almost unexplored, compounds with antibacterial, antifungal, antidiabetic, and antiviral activity in vitro isolated from fungi have been described. These data will uncover the potential of the chemical and biological space of unexploited fungal-specialized metabolites. Additionally, they will demonstrate further evidence of their ability to synthesize complex structures applicable in various scientific and industrial fields. Finally, how the known interspecific relationships support the search for antibacterial chemicals from the nest mycobiota is also explained.

# Search Strategy

This review began with an independent search for pairwise combinations, using "and" or "+" operators, of the English words "fungus," "mycobiota," "filamentous fungi," "yeast," "molecule," "compound," "isolation," and "natural product" with "ant nest," "mound," and "ant." The search engine Google Scholar and the databases PubMed, ScienceDirect, SciFinder, SciELO, Redalyc.org, JSTOR, Web of Science, and EBSCO were used. In the case of SciELO, the same words were searched for in Spanish and Portuguese. The American Chemical Society, Wiley, Springer, SAGE, Thieme, Royal Society of Chemistry, Canadian Science Publishing, and Taylor & Francis publishers were also consulted directly. Also, tracking additional publications in listed references was also useful. In summary, literature prior to December 2022 on fungal diversity associated with ants, their cuticle, and nests, as well as its chemical composition, were considered for discussion. Then, the publications that did not detail the origin of the mycobiota or the method to determine the fungal species, as well as those that did not provide sufficient evidence for the identification or elucidation of compounds, were excluded; the rest is discussed in this review; laboratory colony-based studies were also considered. The analysis of the mycobiota is restricted to that from healthy terrestrial ants and nests, whose identification of ants and fungi is at least at the genus level. The names of ant and fungal species were verified in the Integrated Taxonomic Information System, as well as AntCat, AntWeb databases, or directly in the report of their discovery (ITIS 2022; Bolton 2023; California Academy of Science 2023).



Fig. 1 Samples from which ant/nest-associated mycobiota have been isolated. (A) Entrance (mounds). (B) Fungal garden (young and old), waste, chambers walls (waste, garden, and brood), and tunnel systems. (C) Ant's cuticle (mainly mesosome) and glands (metapleural and buccal)

### Discussion

# **Ants and Their Nests**

Ants are a diverse, taxonomically functional group of insects classified in the Formicidae family. These organisms have existed for at least 100 million years and were the first social insects with predatory habits on Earth (Fernández 2003). Ants live in almost all terrestrial environments, underground or in trunks, branches, or subcortical cavities; only Antarctica, Iceland, Greenland, and the central Pacific islands do not have native species (Rojas Fernández 2001). Ants' abundance is difficult to measure, but they are always in the most copious group of the edaphic macrofauna. The number of species and how they are distributed are unknown. However, their abundance in tropical, low-lying subtropical forests, and hot deserts is well established; temperature is the most critical factor limiting its distribution (Rojas Fernández 2001; Fernández 2003). Currently, more than 12,500 species belonging to 21 subfamilies and 290 genera have been described; nevertheless, it is suggested that the number of species could be up to 30,000, with some awaiting discovery. Among the known taxa, Myrmicinae and Formicinae subfamilies are the most studied (Ríos-Casanova 2014; Boudinot 2015; Bolton 2023).

Ants live in hierarchical communities within which it is possible to distinguish a worker and a reproductive caste. The number of individuals can range from dozens to hundreds of thousands, with specimens ranging from less than a millimeter to 1.5 cm in length (Ríos-Casanova 2014). Considering their diet, ants are highly specialized and generalist and could be classified as omnivorous, mycophagous, granivorous, and predatory (Rojas Fernández 2001). A variety of ant species occasionally feed on fungi, but *Attini* tribe are remarkably interesting as they grow fungal "gardens" within their nests and feed themselves almost exclusively with mycelium. Species of the *Atta*, *Acromyrmex*, and *Sericomyrmex* genus are called "leafcutters" or "foragers" for their skills to collect fresh plant material as a substrate for the growing fungus, while others, mainly of the *Cyphomyrmex*, *Myrmicocrypta*, and *Apterostigma* genera, collect carcasses, feces, and other materials to feed the fungus.

In contrast, *Sericomyrmex* and *Trachymyrmex* have transitional habits (Rojas Fernández 2001; Leal et al. 2011; Sosa-Calvo et al. 2018). It is hypothesized that the development of the metapleural gland played a crucial role in colonization by some ant species in soil (rich in microorganisms). This gland secretes hydroxy and phenylacetic acids that differentially inhibit the growth of microorganisms inside the nests; not surprisingly, species adapted to live in trees have lost this gland (Yek et al. 2012; Vieira et al. 2012; Offenberg and Damgaard 2019; Offenberg et al. 2022).

The impact of ants' activity on soil health has been moderately addressed and principally considers the modification of physicochemical properties. For example, some studies describe the impact of soil, vegetation, and soil fauna transportation on the construction of underground nests, as well as the modification of chemical properties due to mineralization, organic matter accumulation, and decomposition, among other factors (Wagner et al. 1997; Kristiansen and Amelung 2001; Rojas Fernández 2001; Dostál et al. 2005; Pinto-Tomás et al. 2009; Fernandez et al. 2014; Wang et al. 2017; Zhang et al. 2018).

#### **Associated Mycobiota**

Based on the available information and the scope of our current research, this review mainly focuses on fungi isolated from terrestrial ants and their potential as a source of functional secondary metabolites; however, the approaches to study arboreal ants and their associated mycobiota are also summarized in the following paragraph. It is worth mentioning that the chemical composition of ants themselves has already been reported (Mans et al. 2016; Seabrooks and Hu 2017).

Tree ants belong to the Camponotus, Crematogaster, Dolichoderus, Pheidole, Monomorium, Technomyrmex, Allomerus, Cladomyrma, Azteca, and Tretaponera genera, among others. These species have a close relationship with fungi from the Chaetothyriales order, referred to as black yeasts in literature (Weißflog 2001; Ruiz-González et al. 2011; Voglmayr et al. 2011; Nepel et al. 2016; Lucas et al. 2019; Moreno et al. 2019). Interestingly, together with trichomes of some plants, fungal mycelium is part of the walls and galleries of the nest (called carton) or grows in the domatium of a myrmecophyte (Mayer and Voglmayr 2009; Orivel and Leroy 2010; Voglmayr et al. 2011; Nepel et al. 2014; Pringle and Moreau 2017; Baker et al. 2017; Quan et al. 2021). Remarkably, some ants even consume the fungus that develops in the domatium (Blatrix et al. 2012).

Ants with ground-level nests, from which fungi have been isolated, are scarce. Taxonomically (Fig. 2), these individuals are mainly grouped into tribe Attini, which is represented by ants of 7 genera: Apterostigma, Mycocepurus, Myrmicocrypta, Atta, Trachymyrmex, Acromyrmex, and Cyphomyrmex. Other tribes under study with one genus each are Solenopsidini, Tetramoriini, Pheidolini, Formicini, Camponotini, and Tapinomini. The morphology and lifestyle of these species considerably differ depending on their tribe, and the size and structure of their nests. Furthermore, they have a different native distribution, and colonize a great variety of ecosystems. The study of ant-associated mycobiota has been carried out by field sampling of soil from nests in nine countries, although the availability of research on filamentous fungi in North and South America stands out (Fig. 3). However, some research on mycobiota is carried out on colonies maintained in the laboratory under controlled environmental and feeding conditions. In the case of Atta sexdens rubropilosa and Atta cephalotes, for example, such studies have led to a better understanding of the fungal diversity inside the nests, chambers, and the ants themselves (Fisher et al. 1996; Carreiro et al. 1997, 2004; Rodrigues et al. 2005b).

Fungi associated with wild mature nests have been characterized by sampling mound's soil, taken from the surface to a certain depth (3–40 cm)—often discarding detritus (Brill et al. 1996; Duff et al. 2016; Maksimova et al. 2016)—as well as the walls and contents of chambers (waste, garden, and breeding), by means of a reasonable excavation aside the entrances (Fisher et al. 1996; Ba et al. 2000; Rodrigues et al. 2014). Likewise, fungi away from the nest (1–10 m) are also considered in studies for comparative purposes (Arcuri et al. 2014; Rodrigues et al. 2014; Duff et al. 2016; Maksimova et al. 2016). Conversely, nest mycobiota do not always consider a description of fungi on or inside the ants (Arcuri et al. 2014; Maksimova et al. 2016).

Ant-associated fungi from soil of nest and fragments of the fungal garden are commonly isolated by conventional techniques based on sample dilution in sterile water and direct seeding in Petri dishes containing, yeast-malt extract agar (Fisher et al. 1996), potato dextrose agar (Rodrigues et al. 2008), glucose-peptone-yeast agar (Maksimova et al. 2016), and medium for aquatic yeasts (Carreiro et al. 1997). Antibiotics such as chloramphenicol (Arcuri et al. 2014; Rodrigues et al. 2014), amoxicillin (Jiménez-Arreola et al. 2020), oxytetracycline (Fisher et al. 1996), and levomycetin (Maksimova et al. 2016) are frequently added to the medium to prevent bacterial growth. It is worth mentioning that in addition to molecular methods some of the filamentous fungi reported in this compilation were identified using classic microbiological methods, which is limited in the identification of fungal taxonomic groups without properly defined morphological keys of their colonies or spores in the bibliography (Fisher et al. 1996; Rodrigues et al. 2008). Conversely, yeast identification is usually performed by genetic means (Carreiro et al. 1997; Rodrigues et al. 2009; Pagnocca et al. 2010; Arcuri et al. 2014).

Studies on fungal microbiome frequently examine anthills of Acromyrmex and Atta ants from Canada, the USA, and some Central and South American countries, mainly Brazil. Additional research has also been carried out in Nigeria and Russia; however, there is a lack of knowledge of the mycobiota found in this niche in Europe, Asia, and Oceania (Fig. 3). Research focused on studying non-mutualistic ant-associated fungi from Brazil led to the identification of species from Acremonium, Escovopsis, Fusarium, Mucor, Escovopsioides, Metarhizium, and Mariannaea genera; all isolates related to A. sexdens rubropilosa. Moreover, Trichoderma species have also been isolated from ants of the Acromyrmex genus (Rodrigues et al. 2005b; Augustin et al. 2013; Montoya et al. 2016; Armando et al. 2017). Species from the Leucocoprinus genus have received particular attention since they are cultivated by mycophagous ants (Lugo et al. 2013; Luiso et al. 2020). Yeast species from Candida, Trichosporon, Debaryomyces, Geotrichum, Hannaella, Cryptococcus, and others have also been described in association with Atta, Myrmicocrypta, and Solenopsis ants in Brazil and the USA (Ba et al. 2000; Pagnocca et al. 2010; Arcuri et al. 2014). A review on the diversity of yeasts associated with fungus-growing ants found that the orders



**Fig. 2** The evolutionary analysis was constructed by the maximum likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method and General Time Reversible model, using the cytochrome oxidase subunit I gene (sequences used to perform the analysis, alignment, as well as the original tree are provided as Supporting Information file). The tree with the highest log likelihood (–2079.03) is shown. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite

# *Saccharomycetales*, *Tremellales*, and *Trichosporonales* are the most common (Bizarria et al. 2022).

Based on comparative studies, it is known that, in general, the mycobiota differs by ant species and even between the interior and exterior of the nests, tending to isolate more rare taxa in ant colonies. Not surprisingly, fungal microbiota differs even between nests of the same ant species; such variations are mainly due to topographic gradients, temporality of the ecosystem, and plant substrate for leafcutter ants (Kaspari et al. 2010; Rodrigues et al. 2011; Reis et al. 2015; Pereira et al. 2016; Russell et al. 2017; Delgado-Baquerizo et al. 2019; Parmentier et al. 2020; Lindström et al. 2021; Siedlecki et al. 2021). These differences also extend to nematodes. For example, it has been proposed that within the nests, a unique microenvironment is created, in which microbes adapt and diverge from the microbiome of the surrounding soil, phenomena mainly due to temperature stability and the continuous processes of organic material decomposition (Laakso et al. 1998; Lindström et al. 2018, 2019). Specifically, in the nests of Aphaenogaster rudis, the richness of phytopathogenic fungi was lower, compared to that of the nearby soil (Tarsa et al. 2018). In nests of the

likelihood (MCL) approach and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter=0.1234)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved eight nucleotide sequences. *Andrena xera* (GenBank ID: OQ223003.1) was used as an outgroup. Codon positions included were 1st+2nd. There was a total of 722 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 (Tamura et al. 2021)

arboreal ant Lasius fuliginosus and Azteca trigona, it was also observed that the fungal community is different from that of the surrounding land over time (Lucas et al. 2017; Brinker et al. 2019). Moreover, some patterns have been noted in several ant species, for example, fungi isolated from Pogonomyrmex occidentalis nest in wood-decaying differ from the mycobiota in dead pines or the dominant vegetation around the nest (Carlson and Whitford 1991; Lupala et al. 2019). Another example involves mycorrhizal fungi, which are more copious in the mounds of harvesting ants (Pogonomyrmex spp.) than in the surroundings. Moreover, it has been projected that the foraging activity of Messor spp. influences soil fertility in nests, increasing microbial biomass and its activity (Snyder et al. 2002; Ginzburg et al. 2008). Additionally, it was found that the *Trichoderma* genus and mycorrhizal fungi are more abundant in plant material rejected by Atta spp. than that deposited in the mound (Van Bael et al. 2009; Rocha et al. 2017).

The diversity of fungi isolated from ants and their nests is summarized in Fig. 4, regardless of whether a comparison was made among the surrounding soil, or the colony was captive or wild (Ba et al. 2000; Arcuri et al. 2014;



Fig. 3 Geographical distribution of ant nests from which fungi have been isolated from direct soil samples; the study of fungi on the cuticle or the interior of the ants is reflected when it is also available. The dots approximate the location. References are listed in Supplementary Information

Rodrigues et al. 2014; Duff et al. 2016; Maksimova et al. 2016; Montoya et al. 2016). The mycobiota at the genus level isolated from ant nests in the field, compared to that of the colony surroundings, as raised in some investigation, is summarized in Fig. 5 (Rodrigues et al. 2014; Duff et al. 2016; Montoya et al. 2016).

#### Ant Cuticles

Fungi isolated from ants' cuticles and their interior are scarce with only six reports found in the literature (Fig. 4), all of them are attributable to ants, and just a few reports dealing with fungi isolated from the nest. Fungi isolated from ants are described in this subtopic. Conversely, actinobacteria living in symbiosis with ants are the most studied microorganisms. In this review, fungi carried by ants were considered part of the nest mycobiota, considering they are distributed by these arthropods from outside and between nest spaces, either from their cuticle or, for example, from their gut through feces. Hyaline filamentous fungi were isolated in Brazil from Atta laevigata workers. The most abundant fungal isolates were Alternaria arborescens, Bipolaris sorokiniana, Bipolaris eleusines, Bipolaris zeae, Curvularia trifolii, and Paraphaeosphaeria michotii, species mainly associated with plants (Guedes et al. 2012). A search for fungi in young queen ants of Atta capigura and A. leviagata concluded that the genera *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Ochroconis*, *Phaeococcomyces*, *Phialophora*, and *Penidiella* are the most common filamentous fungi (mainly dematiaceous), whereas *Aureobasidium*, *Candida*, and *Cryptococcus* are the most represented yeasts (Pagnocca et al. 2008; Miranda Duarte 2013; Duarte et al. 2014). Interestingly, ants play a role as dispersers of mycobiota in nature. In fact, it has been proven that they are vectors of pathogenic species to humans. For example, it was reported that in several hospital areas in Greece, Brazil, France, and Iran, ants carry some opportunistic fungi such as *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., and *Mucor* sp. All represent the known causal agents of mycoses (Aquino et al. 2013).

Remarkably, although entomopathogenic fungi are usually isolated from insect bodies, the prevalence of *Cordyceps* sp. in healthy ants is low, as demonstrated by Hughes in 2004, according to a study in which the cuticle of four different species of foraging ants from a tropical forest in Panama was examined (Hughes et al. 2004). Interestingly, dead ant specimens are a better source of entomopathogenic fungi and have led to the isolation of *Aspergillus parasiticus, Aspergillus ochraceus, Beauveria bassiana, Metarhizum anisopliae, Pandora formicae, Ophiocordyceps* sp., and *Kneallhazia solenopsae* species, all of them from dead females of *Atta mexicana*, workers of *Atta bisphaerica*, specimens of *Formica* sp.,



1. Aphaenogaster, Apterostigma, Camponotus, Mycocepurus, Myrmicocrypta, Tapinoma and Tetramorium.

- 2. Absidia, Acremonium, Clonostachys, Cytospora, Epicoccum, Escovopsis, Neofusicoccum, Nigrospora and Phoma.
- 3. Agaricus, Alternaria, Alysidium, Aureobasidium, Beauveria, Beltrania, Bionectria, Bipolaris, Calonectria, Ceratocystis, Ceriporiopsis, Chaetomium, Chaetothyriales, Chloridium, Cladophialophora, Colletotrichum, Coniochaeta, Coriolopsis, Corynespora, Cylindrocladium, Cytosporella, Discosia, Dothideales, Escovopsioides, Eutypella, Geomyces, Gliomastix, Gleosporium, Gloeotinia, Glomerella, Gongronella, Grammothele, Guignardia, Humicola, Hyphodermella, Hypocrea, Hypomyces, Idriella, Logula, Macrophoma, Marasmius, Mariannaea, Microsphaeropsis, Monacrosporium, Moniliella, Mortierella, Mycoleptodiscus, Mycosphaerella, Myrmecridium, Neonectria, Neosartorya, Nodulosporium, Ochroconis, Oidiodendron, Oudemansiella, Papulaspora, Paraphaeosphaeria, Penicillifer, Peniophora, Pestalotiopsis, Phaeomoniella, Phaeoseptoria, Phaeosphaeria, Phanerochaete, Phlebia, Phlebiosis, Phyllosticta, Pochonia, Podospora, Preussia, Pseudallescheria, Pseudoplagiostoma, Purpureocillium, Ramichloridium, Rhinocladiella, Rhizocunia, Rhizopus, Robillarda, Scedosporium, Schizophyllum, Scytalidium, Setophoma, Spegazzinia, Stachybotrys, Umbelopsis, Verticillium, Viridiospora, Volutella, Xylaria and Zygorhynchus.
- 4. Anthracocystis, Apiotrichum, Cystofilobasidium, Moesziomyces, Rhodosporidiobolus, Saccharomyces and Starmerella.
- Blastobotrys, Brettanomyces, Bullera, Bulleromyces, Carcinomyces, Coniochaeta, Cystobasidium, Debaryomyces, Exophiala, Farysia, Galactomyces, Geotrichum, Haglerozyma, Hanseniaspora, Holtermanniella, Kazachstania, Kodamaea, Kwoniella, Langdonia, Moniliella, Nadsonia, Ogataea, Pseudozyma, Saitozyma, Schwanniomyces, Sporidiobolus, Sporisorium, Sporobolomyces, Sydowia, Sympodiomycopsis, Tausonia, Torulaspora, Tremella, Ustilago, Wickerhamiella, Wickerhamomyces and Yamadazyma.

**Fig. 4** Fungal microbiota associated with ground ant and their nests. The diversity of ants' fungal symbionts and their parasites was registered in a representative way based on the available information; studies with this approach were not considered. Myc-

obiota from laboratory and field colonies were considered equally and that of the ants when included. This figure was generated with data reported in the Supporting Information file for yeasts and filamentous fungi

*Camponotus* sp., and *Solenopsis* sp. (Sokolova and Fuxa 2008; Ribeiro et al. 2012; Kobmoo et al. 2015; Małagocka et al. 2017). Furthermore, *Aspergillus nomius* was isolated from *A. sexdens rubropilosa*, and it was suggested that its pathogenicity comes from the mycotoxins it produces,

such as aflatoxins B1 (2) and G1 (3) (Da Silva-Junior et al. 2017). On that subject, it has been demonstrated that certain entomopathogenic fungi could perform well in ants' biocontrol (Ortiz and Orduz 2001; López Arismendy and Orduz Peralta 2002; Ribeiro et al. 2012).



Among the fungal species internally colonizing ants, the most common species include some entomopathogenic species in *Acromyrmex octopinosus*, intracellular parasites of *Microsporidia* genus and yeast in *Formica excelsa*, *Debaryomyces polymorphus* in the infrabuccal pocket of *Camponotus vicinus* (Van Borm et al. 2002; Mankowski and Morrell 2004; Johansson et al. 2013), and endoparasitic fungi inhabiting ant species (*Aegeritella* sp., *Laboulbenia* sp., *Ricki* sp., *Hormiscium* sp., *Myrmicinosporidium* sp.) of the Holarctic biogeographic region (Espadaler and Santamaria 2012).

## Anthills

The interiors of anthills are a series of complex, interlaced tunnels with various chambers to provide some larger areas inside the nest. These chambers have a variety of uses including storage areas for food, nurseries for ant larvae and their caretakers, and even areas for ants to simply rest. According to the literature, several filamentous fungi and yeasts have been isolated from anthills, the former being the most studied. To date, due to the number of species grouped together, Trichoderma spp. stand out among the filamentous ones, while Can*dida* and *Cryptoccocus* are the most reported among yeasts. The association of this fungal diversity with some ant species is described below, although it is important to consider that most of the available information contemplate ant species of the Attini tribe (Fig. 4). So far, 360 species of fungi associated with ants and their nests have been isolated, 229 are filamentous, and 131 yeast-like, classified into 120 and 53 genera, respectively. This information was generated from the study of 34 species of ants, belonging to 13 genera, mainly Acromyrmex and Atta. The apparent diversity of filamentous fungi in Fig. 4 owes to the fact that most of these studies have focused on such microorganisms. Moreover, it can be noted that in terms of the number of fungal species, those found only in the nests are more copious than those found in the surrounding soil, for both filamentous and yeast-like species (Fig. 5). It cannot be overlooked that the fungal diversity associated with nests is the result of modifying that originally found in the soil, and that the differences observed are in fact, the effect of the establishment of ant's colonies. In general, the diversity of fungi associated with nests is outstanding, although the genus varies from ant species, time, and geographical location.

From the nest mounds of *F. aquilonia* ants in Novosibirsk, Russia, yeast species belonging to the *Debaryomycetaceae* family (*Debaryomyces hansensii* and *Schwanniomyces vanrijiae*) have been isolated. Notably, fungi isolated from the mounds differed from those species colonizing the surroundings (*Trichosporon moniliforme* and *Cystofilobasidium capitatum*) (Maksimova et al. 2016).

Similar differences in the distribution of filamentous fungi were found for *Formica ulkei* in Alberta and Nova Scotia, Canada. In this case, *Aspergillus navahoensis*, *Aspergillus pseudodeflectus*, *Aspergillus* spp., *Paecilomyces* sp., and *Penicillium* sp. were the most copious fungi in the mounds. In contrast, *Cladosporium cladosporioides*, *Geomyces pannorum*, *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., and *Phoma* strains were the dominant species in the surroundings. Temperature and water availability in mounds are hypothesized to differentiate the ant/ nest-associated fungi from species colonizing nearby soil (Duff et al. 2016). It should be noted that nest sediments and neighboring anthills are a great source of entomopathogenic fungi, especially *M. anisopliae* and *B. bassiana* (Hughes et al. 2004; Angelone and Bidochka 2018), highlighting the ecological role of those fungal species in preventing anthill from other insects.

From nest interiors, especially fungal gardens, and waste deposits of A. sexdens and Myrmicocrypta sp., yeasts of Candida, Rhodotorula, and Trichosporon genus prevail, with Candida dubliniensis, Candida oleophilia, Cryptococcus haglerorum, Trichosporon chiarellii, and Hanseniaspora uvarum being the most common species (Carreiro et al. 1997; Middelhoven et al. 2003; Pagnocca et al. 2010). In addition, Candida parapsilosis and Candida lipolytica were identified in the brood chambers of Solenopsis invicta or "ant fire" (Ba et al. 2000). Concerning filamentous fungi within ants' nests, Leucoagaricus gongylophorus stands out as a symbiont of foraging ants; in-depth aspects such as its distribution among ant species or their lineage are not included in this review. However, according to the available information, this fungus and its parasite (Escovopsis sp.) are widely distributed throughout various ant species, and considered to have coevolved together with ants (Seifert et al. 1995; Currie et al. 2003; Lugo et al. 2013; Mueller et al. 2017; Bich et al. 2020). It should be added that only certain species of *Escovopsis* are considered opportunistic parasites and a pair of members have been reclassified into new genera, Sympodiorosea and Luteomyces (Montoya et al. 2021). In addition, E. nivea has





Aphaenogaster texana, Atta bisphaerica, Atta sexdens rubropilosa, Camponotus spp., Formica ulkei, Solenopsis invicta, Tapinoma sessile and Tetramorium caespitum.



**Fig. 5** Venn diagram of filamentous (**a**) and yeast-like fungi (**b**) isolated from nests and in their vicinity. In the case of nests, sampling points are specified. The genera are presented together with the number of species they include; only those >1 are

specified. In parentheses is the total number of genera, and at the end of each section the species of ants in the nests are listed. This figure was generated with data reported in the Supporting Information file

also been identified as an antagonist of fungal gardens (Pietrobon et al. 2022). Up to today, the chemical composition of *L. gongylophorus* remains largely unknown, but given its importance as food for ant colonies, its study may be of interest from a nutraceutical point of view. It has also been suggested that certain fungi collaborate with *L. gongylophorus* on degrading plant material (Rodrigues et al. 2005b). Moreover, inhibition of the symbiotic fungus is a proposed target for ant control (Della Lucia et al. 2014; Araújo et al. 2022). Several species of *Trichoderma* genus are commonly found in the chambers-nest garden of *Atta* and *Acromyrmex* genus, for example, *A. sexdens rubropilosa*, *A. lobicornis*, and *A. lundii* (Montoya et al. 2016; Armando et al. 2017). From *Acromyrmex*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma inhamatum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningiopsis*, and *Trichoderma aff. Neotropical*, among others, have been identified (Armando et al. 2017). *Trichoderma* spp. have been proposed to be a pathogen of *Trachymyrmex*  *septentrionalis* fungal gardens (Kyle et al. 2023). In addition, several new species of *Trichoderma*, including *T. attinorum*, *T. texanum*, and *T. longifialidicum* spp. Nov., have been discovered (Montoya et al. 2016).

Interestingly, it was found that the foraging ant *Atta colombica* does not prefer plants with a high abundance of endophytes; the 30–43% increase in the time required to cut, transport, and clean this type of tissue was shown to be an undesirable cost. Furthermore, since this preference is independent of endophyte diversity, it is suggested that the techniques used by ants are general. Further, it was found that

the colonization by the symbiont fungus showed the same performance in plant tissues with a high and low abundance of endophytes (Bittleston et al. 2011; Van Bael et al. 2012).

The mycobiota diversity isolated from fungal gardens may reflect the endophytic and epiphytic mycobiota of the plant material collected by ants, which vary over time, as detailed in a report on *A. cephalotes* from which *Aspergillus niger*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis glandicola*, *Phomopsis illicit*, and *Phomopsis quercella*, among other species, have been identified (Fisher et al. 1996). In addition to the fungal composition in healthy



**Fig. 6** The evolutionary analysis was constructed by the maximum likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method and General Time Reversible model, using the 18S rDNA sequence (SSU region). All sequences were obtained from the NCBI or SILVA database (Glöckner et al. 2017) (sequences used to perform the analysis, as well as the original alignment and tree files, are provided as Supporting Information files). The tree with the highest log likelihood (–6451.37) is shown. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances

estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter=0.6421)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 154 nucleotide sequences. *Giardia ardeae* (SILVA accession number: Z17210) was used as an outgroup (branch length=2.20). There were a total of 419 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 (Tamura et al. 2021) nests of *A. sexdens rubropilosa*, there has been an interest on knowing the fungi that mainly establish in the fungal garden of intoxicated or abandoned colonies, noting that the parasite *Escovopsis* spp. cannot only establish in these weakened nests (Rodrigues et al. 2005a, b; Carlos et al. 2011).

Today, the fungal strains isolated from ants or their nest are all within the *Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota*, and *Zoopagomycota* phyla. Among them, the most represented subphylums are *Pezizimycotina* with 82 plus genera, *Saccharomycotina* (19), *Agaricomycotina* (35), *Ustilaginomycotina* (6), *Mucoromycotina* (5), and finally *Mortierellomycotina* and *Zoopagomycotina* with one genus each (Fig. 6). This data highlights the broad fungal diversity carried by ants and that enclosed in their nests, and at the same time, projects this ecological niche as a rich source for rare cultivable fungi.

#### **Chemical Compounds**

Chemical information available on ant-associated fungi demonstrates the ability of these microorganisms to synthesize complex structures with unknown ecological roles. Notwithstanding, specialized metabolites produced by fungi are incredibly valuable in drug discovery programs aiming to find new molecules to treat human infectious and chronic diseases (O'Brien and Wright 2011). Currently, only 27 specialized metabolites reported in the literature have been isolated from ant/nests-associated fungi, including triterpenoids, indolterpenoids, and linear and polyaromatic polyketides. This chemical information has been partially described in some compilations focused on the chemical ecology of microbial and insect interactions (Beemelmanns et al. 2016; Van Arnam et al. 2018; Worsley et al. 2018; Batey et al. 2020; Menegatti et al. 2021). A brief description of the source and biological activity of all isolated molecules is presented in the following lines.

Sulfated triterpenoids A-108835 (4) and A-108836 (5) were obtained from Fusarium compactum cultivated in tomato and oat medium. This fungal strain was isolated from nest-mound soil harvested in Rantan (Nigeria, Africa). The major compound A-108835 (4) is substituted with an acetyloxy group, whereas the minor triterpene sulfate A-108836 (5) differs from A-108835 in the arrangement of the heteroannular diene with 7,8:9,11 position of rings B and C instead of the 8,9:14,15 positions of the C and D rings (Brill et al. 1996). Also, in A-108836 (5), the hydroxy group at C-11 is missing and a methoxy group at C-12 replaced the acetyloxy subtituent at C-12 in A-108835 (4). The initial report on the structure of compound 4 referred to this molecule as a diastereomer with the sodium 3-sulfate of 4,4,24-trimethylcholesta-8,14,24(28)trien- $2\alpha$ ,  $3\beta$ ,  $11\alpha$ ,  $12\beta$ -tetrol-12-acetate, a compound isolated from the plant pathogen Fusarium graminearum. In vitro assays demonstrated that compound 4 inhibited the proteolytic activity of rhinovirus 3C protease (IC<sub>50</sub> 48 µg/ml), a molecular

target to treat the common cold. However, it does not show antibacterial and antifungal activity against human pathogens (Brill et al. 1996). It was found that these triterpene sulfates and some semi-synthetic derivatives can inhibit HIV-1 integrase enzyme with IC<sub>50</sub> values ranging from 4.8 to 15  $\mu$ M, essential in HIV-1 virus replication. A charged group, *e.g.*, a sulfate or carboxy, is required for the antiviral activity demonstrated in a viral spread assay. Unfortunately, these molecules show a very small therapeutic window (Singh et al. 2003).



Chemical investigation of the parasitic fungus Escovopsis weberi obtained from the nest of Acromyrmex echinatior dereplicated a series of shearinine-type indoletriterpenes, including shearinine L (6), M (7), D (8), E (9), and A (10), which were subsequently isolated from its axenic culture in soy flour media. In addition, emodin (11) and cycloarthropsone (12) were also obtained (Dhodary et al. 2018). 10 is a part of a family of indole alkaloids isolated from sclerotioid ascostromata of Eupenicillium shearii, reported as antifeedants of Helicoverpa zea larvae plague in topical application trials (Magnus and Mansley 1999). More recently, the related structure  $\mathbf{6}$  also showed insecticidal effect by decreasing A. octospinosus foraging of substrate impregnated with it, adding a negative allelopathic effect of the parasite Escovopsis to the nests (Dhodary et al. 2018). The insecticidal activity of the indole alkaloids has been linked to the ABC ring system, 1,3,9,9a-tetrahydroindeno[2,1-c] pyran, present in other families of compounds with the same effect (Belofsky et al. 1995). Compounds 8 and 9 were isolated from the seafloor fungus Penicillium

*janthinellum*; these molecules have been described *in* vitro as inducers of apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Compound **9** also prevented epidermal growth factor-induced malignant transformation of JB6 P + Cl 41 cell line in agar with an IC<sub>50</sub> of 13  $\mu$ M (Smetanina et al. 2007). Product **8** was previously dereplicated from *Escovopsis* sp. by comparison of spectrometric data with databases, together with shearinines F and J. Furthermore,

it was determined that aromatic compounds **11** and **12** inhibit the growth of *Leucoagaricus gongylophorus* (symbiotic fungus) in agar diffusion tests (Dhodary et al. 2018), acting as fungicides against the symbiont fungus, promoting foraging ant control. Moreover, it was previously described that certain coumarins related to **11** inhibit *Leucoagaricus* sp. *in vitro*, especially those possessing the 2*H*-chromen-2-one unit (Godoy et al. 2005).



Molecular network analysis guided the isolation and characterization of several specialized metabolites, including the 22,23-dehydroshearinine A (13), and the sulfur-containing diketopiperazines melinacidin IV (14), melinacidin III (15), chetracin B (16), and chetracin C (17) from the extracts of *Escovopsis* sp. Compounds 14 and 8 are synthesized in excess during fungal garden

infection and inhibit the growth of *Pseudonocardia* sp. (Heine et al. 2018). Additionally, the linear polyketide conocandin B (18) and its derivative, conocandin C (19), were isolated from this fungus. Interestingly, 18 also inhibited the growth of *Pseudonocardia* sp., when evaluated *in vitro*, whereas 19 did not show the same activity (Bae et al. 2021) (Fig. 7).



**Fig.7** Symbiotic interactions between ants and the microbiota inside their nests. (A) Under normal conditions, ants of the Attini tribe cultivate the symbiotic fungus to feed their larvae; (B) however, occasionally, an opportunistic fungus settles in the fungal garden. When it occurs, (C) ants detect the problem and apply a chemical treatment,

a product of a different symbiotic relationship. (**D**) It has been found that certain actinomycetes that inhabit ants' cuticles synthesize antifungals that stop the parasite. In addition, (**E**) ants ensure the contact of compounds with the unhealthy part of the fungal garden by mixing them in their mouths



14 x=2; y=2; R=OH 15 x=2; y=2; R=H 16 x=2; y=3; R=OH 17 x=3; y=3; R=OH





*Bionectria* sp. was isolated from the fungal garden of *Apterostigma dentigerum* in Costa Rica. Its fermentation in potato dextrose agar (PDA) revealed the production of bionectriol A (**20**), a glycosylated polyketide, which did not show antifungal activity when tested in coculture trials against *Escovopsis* sp. and *Candida albicans* (Freinkman et al. 2009). Structurally related compounds were isolated from *Bionectria chroleuca*, of which TMC-151E, TMC-151F, and bionectriol C moderately inhibited *Candida* sp. biofilm formation (CI<sub>50</sub> 815.3, 23.5, and 42.3  $\mu$ M, respectively) (Wang et al. 2014).

From the fungus *Talaromyces* sp. IQ-313, isolated from the mound of an anthill located at Huasteca Hidalguense, Hidalgo, Mexico, a series of asymmetric dimeric phenalenones: duclauxin (**21**), talaromycesone B (**22**), xenoclauxin (**23**), and bacillisporin G (**24**) were found when the fungus was cultivated in oat cereal. Biological evaluation of such compounds as inhibitors of a full-length protein tyrosine phosphatase 1B (*h*PTP1B<sub>1-400</sub>), a therapeutic target for developing antidiabetic and anticancer drugs (Jiménez-Arreola et al. 2020), evidenced the potential of these molecules as prototypes for developing hypoglycemic drugs. Other oxyphenalenones were isolated from fungi such as *Penicillium duclauxii*, *Gilmaniella humicola*, and *Neonectria* sp., and have been evaluated mostly as inhibitors of the growth of cancer cell lines (Elsebai et al. 2014).













As for the symbiont fungus, it has been ruled out that its volatile compounds play an ecological role. However, some compounds act as signalers in their interaction with pathogens and maximize their growth in the garden (Folgarait et al. 2011; Bueno de Oliveira 2020; Sousa et al. 2020). Characterization of volatile compounds in culture assays of *Escovopsis* sp. and *L. gongylophorus* has allowed their tentative identification by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis (Masiulionis and Pagnocca 2020).

From Lepiota sp., a fungus isolated from the nest of Cyphomyrmex costatus ant produces lepiochlorin (25) when cultivated in a medium composed of mineral salts and sucrose supplemented with vitamins (Weber 1957; Nair and Hervey 1979). Moreover, Tyridiomyces formicatum, a fungal species obtained from Cyphomyrmex minutus, synthesizes a variety of diketopiperazines, for example, (3S,8aS)-3-isobutylhexahydropyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine-1,4-dione (26), (3S,8aS)-3-benzylhexahydropyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine-1,4-dione (27), and (3S,8aR)-3-benzylhexahydropyrrolo[1,2- $\alpha$ ] pyrazine-1,4-dione (28), when cultivated in potato dextrose broth supplemented with tryptone; their evaluation as inhibitors of Candida sp. growth showed that these molecules had a weak effect compared to the positive control nystatin (Wang et al. 1999). It is worth mentioning that some compounds with antibiotic activity have been isolated from Leucoagaricus species although they are not listed as ants' symbionts (Ilnuma et al. 1983; Huff et al. 1994).

The limited number of specialized metabolites isolated from ant/nest-associated fungi considerably focuses on the chemical composition of the parasitic fungus *Escovopsis* sp. and the symbiotic taxa *Leucoagaricus* sp. These data show the lack of research, not only regarding the mycobiote of the enormous diversity of ant species available, but also the chemical composition of their fungi and how this could favor the discovery of new functional chemical entities with potential applications in human or veterinary medicine, agriculture, and research, to mention a few areas (Scherlach et al. 2013; Meena and Siddhardha 2019). However, the importance of understanding the role that these secondary metabolites of microbial origin play in these biological systems should not go unnoticed (Frey Klett et al. 2011; O'Brien and Wright 2011; Moreau 2020).

#### **Nest Interspecific Relationships**

Studies on the ecological interaction of fungi inhabiting ants or their nests have proposed that species of the Attini tribe, mainly those cultivating Leucoagaricus gongylophorus, establish a mutualistic symbiotic relationship, which is complemented with Streptomyces, Pseudonocardia, and Burkholderia actinobacteria (Currie et al. 1999, 2006; Currie 2001; Santos et al. 2004; Poulsen et al. 2009; Barke et al. 2010; Seipke et al. 2011; Sit et al. 2015; Dângelo et al. 2016; Goldstein and Klassen 2020; Nascimento et al. 2022). Specialized necrotrophic parasitic fungi such as some species of *Escovopsis* sp. can lead to colony death, especially when invading the fungal gardens of susceptible nests; however, certain actinobacteria are known to prevent the growth of this parasite by producing antifungal compounds (Reynolds and Currie 2004; Sen et al. 2009; Schoenian et al. 2011; Jiménez-Gómez et al. 2021). For example, *Trachymyrmex* cf. zeteki carries actinobacteria in its cuticle and mixes them with unhealthy parts in an infraoral pouch to clear infections; other species of the Attini group carry them in complex cuticular modifications (Little et al. 2006; Li et al. 2018) (Fig. 7). The putative symbiotic nature of the ant-actinobacteria relationship remains under discussion; nevertheless, the recruitment of effective actinobacteria against Escovopsis sp. by ants has been described (Mueller et al. 2008). A similar relationship has been described for Allomerus decemarticulatus and Allomerus octoarticulatus ants that inhabit plant cavities constructed with fungi of the order Chaetothyriales, carrying bacteria









31





of *Streptomyces* and *Amycolatopsis* genera capable of inhibiting the growth of fungi contaminating their nests, for example, *Annulophypoxylon* spp. and *Chaunopyc-nis* spp. (Seipke et al. 2012). In addition, it has been proposed that black yeasts (*Phialophora* genus) are an additional component of the ant-actinobacteria relationship, since some isolated species of ants can inhibit the development of actinobacteria and impact their effect on *Escovopsis* sp. (Little and Currie 2007, 2008). The opportunistic microorganisms of the nests can also be

bacteria. *Amycolatopsis* bacterium was isolated from the fungal garden of *Trachymyrmex smithi*; from this microorganism, nocamycin V (**29**), a heterotricyclic compound capable of inhibiting the growth of *Pseudonocardia* sp. strains under laboratory conditions, was obtained from its extract (Hansen et al. 2022).

Some of the compounds that have been reported as inhibitors of fungi *Ecovopsis* sp. and its derivatives are summarized below. Several dentigerumycins have been found since the discovery of dentigerumycin (1) from a strain of Pseudonocardia associated with the nest of Apterostigma dentigerum. Compound 1 was one of the first molecules identified as a mediator of ant-actinobacteria mutualism by in vitro growth inhibition assays of Escovopsis sp. (IC<sub>50</sub> 2.8  $\mu$ M), but it does not affect the symbiotic fungus (Oh et al. 2009). Another molecule, candicidin C (30), was dereplicated as the major component of the bioactive fractions of Streptomyces sp., isolated of Acromyrmex octospinosus. This molecule is capable of inhibiting the development of E. weberi and Escovosis aspergilloides but not L. gongylophorus (Haeder et al. 2009). Subsequent investigations with Pseudonocardia associated with Attini ants led to the finding of other compounds. GE37468 (31) is a known thiopeptide isolated from bacteria related with the cuticle of T. septentrionalis ant, which antagonize other bacteria of the same genus in the nest (Chang et al. 2020). Other important molecules are dentigerumycin F(32) and anttimicin (33); the former was found in the actinobacteria extract when it was cocultured with the Escovopsis supernatant, while the latter, known as a siderophore compound, inhibited the development of the parasite in its iron-depleted form  $(IC_{50} 12.5 \ \mu g/ml)$  (Bae et al. 2021; Fukuda et al. 2021). Dereplication of compounds from antimicrobial extracts of Pseudonocardia sp., Streptomyces sp., and Escovopsis sp. by spectrometric analysis and the identification of multiple biosynthetic pathways of antibiotics have been recurrent (Barke et al. 2010; Seipke et al. 2011), as well as by direct analysis of the ant exoskeleton (Boya et al. 2017; Gemperline et al. 2017).

All these compounds that share chemical and biological features, for example, are made up of highly modified amino acids, the cyclic depsipeptide, or polyene cores, and inhibit the growth of Escovopsis sp. in vitro. Nevertheless, in competition evaluations Pseudonocardia strains also inhibit the growth of the entomopathogenic fungi M. anisopliae (Bruner-Montero et al. 2021). Given the lack of specificity, it is speculated that such molecules also model the ant/nest-associated mycobiota, which would also be expected as an effect of the metapleural glands in some ants and its defensins in general (Schoenian et al. 2011; Yek and Mueller 2011; Vander Meer 2012; Sakolrak et al. 2018). Compound 33 is also synthesized in response to entomopathogenic fungi (Gómez-Díaz et al. 2022), as evidenced by the behavior of ants inside the nests during sanitization of fungal gardens by some species (Goes et al. 2022). In this context, fungi in the nest are expected to have developed adaptation mechanisms based on evolutionary competition, for example, through resistance mechanisms or allelochemical interactions mediated by specialized metabolites. Analogous to the bioprospecting of antifungals, antibacterial, and antiparasitic from ant-associated actinobacteria (Desireé et al. 2013; Holmes et al. 2016; Efimenko et al. 2020; Ortega et al. 2021; Wu et al. 2022),

it is proposed that the nest mycobiota constitutes a rich source of antibacterial molecules, especially useful in the search for treatments for species resistant to conventional drugs (OMS 2020).

## **Perspectives and Future Directions**

The information available on fungal diversity associated with ants and their nests is limited; in this review, it can be noted how most of the research is related to Attini ants and given their economic importance it is not expected for such interest to diminish. Likewise, we anticipate that the description of chemicals from micromycetes will not depart from the study of their role in interactions within Attini nests, in the same way that the subject favored the discovery of a variety of metabolites of bacterial origin (Ramadhar et al. 2014; Artavia-León et al. 2018; Chevrette et al. 2019; Van Moll et al. 2021; Selim et al. 2021). Regarding the rest of ant species, certain bioprospecting studies have allowed to unveil the chemical composition of their mycobiota, although exclusively from filamentous fungi and using conventional techniques in organic chemistry. Perhaps this mycobiota, both filamentous and yeast-like, goes unnoticed, likely due to the belief of its similarity with species isolated from soil; however, according with the information presented, it is proposed to abandon this point of view, as ants modify not only the physicochemical characteristics of the soil in which they settle, but also its microbiota. Accordingly, the way in which this difference can be exploited is promising, as well as the micromycetes associated with arboreal and warrior ants. We believe that studies on the variation of the mycobiota in anthills will continue to offer interesting information, even more with the facilities of massive sequencing techniques, and the development of analytical methods to study their chemical composition.

# Conclusions

Based on the literature revision, the biological diversity of fungi inhabiting ant nests has not been extensively studied. Pioneering research has focused on analyzing soil samples from mounds and nest chambers, and indirectly from ant cuticles. As a result, only a few hundred of ant-associated filamentous fungi and yeasts have been described, being Trichoderma, Penicillium, and Fusarium the most reported genera within the Pezizomycotina subphylum and Candida and Cryptococcus in the Saccharomycotina clade. The majority of chemical entities have been isolated from 14 ant species, mainly of the Acromyrmex and Atta genera found in the American continent, perhaps because of their economic importance as pests. Since this information was obtained almost exclusively through classical methods in microbiology, the application of modern massive sequencing techniques would help to fill this gap due to many ant species and their cosmopolitan nature. Also, the diversity of the secondary metabolites produced by these microorganisms and their potential application are promising fields. In the background, compounds with *in vitro* antibacterial, antifungal, antidiabetic, and antiviral activity have been mentioned, as well as interspecific relationships that place the anthills' mycobiota as a source of chemical entities whose bioactivity should be pondered through bioprospecting studies, leading to discover molecules with applications in human or veterinary medicine, agriculture, and research, to mention a few. Finally, the ecological role of fungi in nests is just beginning to take place in relationships that have been investigated for a few years.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3.

Acknowledgements ASAC thanks CONACyT for the scholarship (885837) for postgraduate studies.

Author Contribution ASAC collected and analyzed all data presented and wrote the first draft. JRC analyzed and revised the manuscript. Both the authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This work was funded by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422 and IA203220.) It also received partial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT: CF-2019-263977).

**Data Availability** The data used and/or analyzed during this review are provided as supporting information files.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

# References

- Agarwal S, Sharma G, Verma K, Latha N, Mathur V (2022) Pharmacological potential of ants and their symbionts – a review. Entomol Exp Appl 170:1032–1048. https://doi.org/10.1111/eea.13236
- Aldholmi M, Marchand P, Ourliac-Garnier I, Le Pape P, Ganesan A (2019) A decade of antifungal leads from natural products: 2010–2019. Pharmaceuticals 12:182. https://doi.org/10.3390/ ph12040182
- Angelone S, Bidochka MJ (2018) Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. J Invertebr Pathol 156:73–76. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.009
- Aquino RSS, Silveira SS, Pessoa WFB, Rodrigues A, Andrioli JL, Delabie JHC, Fontana R (2013) Filamentous fungi vectored by ants (Hymenoptera: Formicidae) in a public hospital in

- Araújo S, Seibert J, Ruani A, Alcántara-de la Cruz R, Cruz A, Pereira A, Zandonai D, Forim M, Silva MF, Bueno O, Fernandes J (2022) The symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) as a target organism to control leaf-cutting ants. Insects 13:359. https://doi.org/10. 3390/insects13040359
- Arcuri SL, Pagnocca FC, Da Paixão Melo WG, Nagamoto NS, Komura DL, Rodrigues A (2014) Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Antonie Van Leeuwenhoek 106:475–487. https://doi.org/10. 1007/s10482-014-0216-2
- Armando NG, Marfetán JA, Folgarait PJ (2017) Trichoderma species associated with *Acromyrmex* ant nests from Argentina and first report of *Trichoderma lentiforme* for the country. Darwiniana 5:72–82. https://doi.org/10.14522/darwiniana.2017.51.724
- Artavia-León A, Pacheco-Leiva M, Moya-Román C, Rodríguez-Hernández N, Pinto-Tomás AA (2018) Ant microbial symbionts are a new model for drug discovery. Drug Discov Today Dis Models 28:27–33. https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.08.011
- Augustin JO, Groenewald JZ, Nascimento RJ, Mizubuti ESG, Barreto RW, Elliot SL, Evans HC (2013) Yet more "weeds" in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. PLoS ONE 8:e82265. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082265
- Ba AS, Phillips SA, Anderson JT (2000) Yeasts in mound soil of the red imported fire ant. Mycol Res 104:969–973. https://doi.org/ 10.1017/S0953756299002385
- Bae M, Mevers E, Pishchany G, Whaley SG, Rock CO, Andes DR, Currie CR, Pupo MT, Clardy J (2021) Chemical exchanges between multilateral symbionts. Org Lett 23:1648–1652. https:// doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00068
- Baker CCM, Martins DJ, Pelaez JN, Billen JPJ, Pringle A, Frederickson ME, Pierce NE (2017) Distinctive fungal communities in an obligate African ant-plant mutualism. P R Soc B 284:20162501. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2501
- Barke J, Seipke RF, Grüschow S, Heavens D, Drou N, Bibb MJ, Goss RJ, Yu DW, Hutchings MI (2010) A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. BMC Biol 8:109. https://doi.org/10. 1186/1741-7007-8-109
- Batey SFD, Greco C, Hutchings MI, Wilkinson B (2020) Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. Curr Opin Chem Biol 59:172–181. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.001
- Beemelmanns C, Guo H, Rischer M, Poulsen M (2016) Natural products from microbes associated with insects. Beilstein J Org Chem 12:314–327. https://doi.org/10.3762/bjoc.12.34
- Belofsky GN, Gloer JB, Wicklow DT, Dowd PF (1995) Antiinsectan alkaloids: shearinines A-C and a new paxilline derivative from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. Tetrahedron 51:3959– 3968. https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00138-X
- Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M (2016) Potential applications of insect symbionts in biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 100:1567–1577. https://doi.org/10.1007/ s00253-015-7186-9
- Bich GÁ, Randon DN, Castrillo ML, Villalba LL, Zapata PD (2020) Aislamiento y caracterización morfológica y molecular de cepas de *Escovopsis* aisladas de nidos de hormigas cortadoras de hojas de Argentina. Rev Mex Biodivers 91:912581. https://doi.org/10. 22201/ib.20078706e.2020.91.2581
- Bignell DE, Anderson JM, Chosse R (1991) Isolation of facultatively aerobic actinomycetes from the gut, parent soil and mound materials of the termites *Procubitermes aburiensis* and *Cubitermes severus*. FEMS Microbiol Lett 85:151–160. https://doi.org/10. 1111/j.1574-6968.1991.tb04707.x-i1

- Bittleston LS, Brockmann F, Wcislo W, van Bael SA (2011) Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. Biol Lett 7:30–32. https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0456
- Bizarria R, Pagnocca FC, Rodrigues A (2022) Yeasts in the attine ant–fungus mutualism: diversity, functional roles, and putative biotechnological applications. Yeast 39:25–39. https://doi.org/ 10.1002/yea.3667
- Blatrix R, Djiéto-Lordon C, Mondolot L, la Fisca P, Voglmayr H, Mckey D (2012) Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of ant-plant interactions. P R Soc B 279:3940–3947. https://doi.org/10.1098/rspb.2012. 1403
- Bolton B (2023) An online catalog of the ants of the world. https:// antcat.org. Accessed 30 Apr 2023
- Boudinot BE (2015) Contributions to the knowledge of formicidae (Hymenoptera, Aculeata): a new diagnosis of the family, the first global male-based key to subfamilies, and a treatment of early branching lineages. Eur J Taxon 2015:1–62. https://doi.org/10. 5852/ejt.2015.120
- Boya CA, Fernández-Marín H, Mejiá LC, Spadafora C, Dorrestein PC, Gutiérrez M (2017) Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. Sci Rep 7:5604. https://doi.org/10.1038/ s41598-017-05515-6
- Brill GM, Kati WM, Montgomery D, Karwowski JP, Humphrey PE, Jackson M, Clement JJ, Kadam S, Chen RH, McAlpine JB (1996) Novel triterpene sulfates from *Fusarium compactum* using a rhinovirus 3C protease inhibitor screen. J Antibiot 49:541–546. https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.541
- Brinker P, Weig A, Rambold G, Feldhaar H, Tragust S (2019) Microbial community composition of nest-carton and adjoining soil of the ant *Lasius fuliginosus* and the role of host secretions in structuring microbial communities. Fungal Ecol 38:44–53. https://doi. org/10.1016/j.funeco.2018.08.007
- Bruner-Montero G, Wood M, Horn HA, Gemperline E, Li L, Currie CR (2021) Symbiont-mediated protection of Acromyrmex leaf-cutter ants from the entomopathogenic eungus Metarhizium anisopliae. mBio 12:e01885–21. https://doi.org/10.1128/mBio.01885-21
- Bueno de Oliveira K (2020) Metabólitos do fungo mutualista das formigas atíneas como mediadores da interação com o parasita Escovopsis. Universidade Estadual Paulista
- California Academy of Science (2023) AntWeb. https://www.antweb. org/. Accessed 1 May 2023
- Carlos AA, Rodrigues A, Forti LC, Passador MM, Sierra JF (2011) Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. J Appl Entomol 135:326–331. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01551.x
- Carlson SR, Whitford WG (1991) Ant mound influence on vegetation and soils in a semiarid mountain ecosystem. Am Midl Nat 126:125. https://doi.org/10.2307/2426157
- Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M, Lachance MA, Bueno OC, Hebling MJA, Ruivo CCC, Rosa CA (2004) Sympodiomyces attinorum sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Int J Syst Evol Microbiol 54:1891– 1894. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63200-0
- Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC, Bacci M, Hebling MJA, Da Silva OA (1997) Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908. Antonie Van Leeuwenhoek 71:243–248. https://doi.org/10.1023/A:1000182108648
- Chang PT, Rao K, Longo LO, Lawton ES, Scherer G, Van Arnam EB (2020) Thiopeptide defense by an ant's bacterial symbiont. J Nat Prod 83:725–729. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00897
- Chassagne F, Cabanac G, Hubert G, David B, Marti G (2019) The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural

Products ®. Phytochem Rev 18:601–622. https://doi.org/10. 1007/s11101-019-09606-2

- Chen S, Cheng D, Liu Z, Hassan B, Xu Y (2022) Community structure and antifungal activity of actinobacteria in a fungus-growing termite. Ecol Entomol. https://doi.org/10.1111/een.13219
- Chevrette MG, Carlson CM, Ortega HE, Thomas C, Ananiev GE, Barns KJ, Book AJ, Cagnazzo J, Carlos C, Flanigan W, Grubbs KJ, Horn HA, Hoffmann FM, Klassen JL, Knack JJ, Lewin GR, McDonald BR, Muller L, Melo WGP, Pinto-Tomás AA, Schmitz A, Wendt-Pienkowski E, Wildman S, Zhao M, Zhang F, Bugni TS, Andes DR, Pupo MT, Currie CR (2019) The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. Nat Commun 10:516. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0
- Currie CR (2001) A Community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. Annu Rev Microbiol 55:357–380. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.357
- Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. Science 311:81–83. https://doi.org/ 10.1126/science.1119744
- Currie CR, Scottt JA, Summerbell RC, Malloch D (1999) Fungusgrowing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. Nature 398:701–704. https://doi.org/10.1038/19519
- Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Straus NA (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. Science 299:386–388. https://doi.org/10.1126/science.1078155
- Da Silva-Junior EA, Paludo CR, Valadares L, Lopes NP, Do Nascimento FS, Pupo MT (2017) Aflatoxins produced by Aspergillus nomius ASR3, a pathogen isolated from the leaf-cutter ant Atta sexdens rubropilosa. Rev Bras Farmacogn 27:529–532. https:// doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.001
- Dângelo RAC, de Souza DJ, Mendes TD, Couceiro J da C, Lucia TMC Della (2016) Actinomycetes inhibit filamentous fungi from the cuticle of Acromyrmex leafcutter ants. J Basic Microbiol 56:229– 237. https://doi.org/10.1002/jobm.201500593
- Delgado-Baquerizo M, Eldridge DJ, Hamonts K, Singh BK (2019) Ant colonies promote the diversity of soil microbial communities. ISME J 13:1114–1118. https://doi.org/10.1038/ s41396-018-0335-2
- Della Lucia TM, Gandra LC, Guedes RN (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. Pest Manag Sci 70:14– 23. https://doi.org/10.1002/ps.3660
- Desireé M, Medina D, Morales GG, Daniel F, Castillo H, María Y, Fuente O, Flores Olivas A (2013) Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Rev Mex De Cienc Agric 4:1187–1196
- De-Wei L (2016) Introduction: advances and predicament. In: De-Wei L (ed) Biology of microfungi. Springer International Publishing, Cham, pp 1–6
- Dhodary B, Schilg M, Wirth R, Spiteller D (2018) Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. Chem Eur J 24:4445–4452. https://doi.org/10.1002/chem.201706071
- Dostál P, Březnová M, Kozlíčková V, Herben T, Kovář P (2005) Antinduced soil modification and its effect on plant below-ground biomass. Pedobiologia 49:127–137. https://doi.org/10.1016/j. pedobi.2004.09.004
- Duarte APM, Attili-Angelis D, Baron NC, Forti LC, Pagnocca FC (2014) Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. Antonie Van Leeuwenhoek 106:465–473. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0215-3
- Duff LB, Urichuk TM, Hodgins LN, Young JR, Untereiner WA (2016) Diversity of fungi from the mound nests of *Formica ulkei* and adjacent non-nest soils. Can J Microbiol 62:562–571. https://doi. org/10.1139/cjm-2015-0628

- Efimenko TA, Glukhova AA, Demiankova MV, Boykova YV, Malkina ND, Sumarukova IG, Vasilieva BF, Rogozhin EA, Ivanov IA, Krassilnikov VA, Efremenkova OV (2020) Antimicrobial activity of microorganisms isolated from ant nests of *Lasius niger*. Life 10:91. https://doi.org/10.3390/life10060091
- Elsebai MF, Saleem M, Tejesvi Mv, Kajula M, Mattila S, Mehiri M, Turpeinen A, Pirttilä AM (2014) Fungal phenalenones: chemistry, biology, biosynthesis and phylogeny. Nat Prod Rep 31:628–645
- Espadaler X, Santamaria S (2012) Ecto- and endoparasitic fungi on ants from the Holarctic Region. Psyche 2012:168478. https:// doi.org/10.1155/2012/168478
- Fernandez A, Farji-Brener AG, Satti P (2014) Moisture enhances the positive effect of leaf-cutting ant refuse dumps on soil biota activity. Austral Ecol 39:198–203. https://doi.org/10.1111/aec.12059
- Fernández F (2003) Breve introducción a la biología social de las hormigas. In Fernández F (ed) Introducción a las hormigas de la región Neotropical, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, pp 89–96
- Fisher PJ, Stradling DJ, Sutton BC, Petrini LE (1996) Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. Mycol Res 100:541–546. https://doi.org/10.1016/ S0953-7562(96)80006-2
- Folgarait PJ, Marfetán JA, Cafaro MJ (2011) Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). Environ Entomol 40:342–349. https://doi.org/10. 1603/EN10111
- Freinkman E, Oh DC, Scott JJ, Currie CR, Clardy J (2009) Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria* sp. associated with the fungus-growing ant *Apterostigma dentigerum*. Tetrahedron Lett 50:6834–6837. https://doi.org/10.1016/j.tetlet. 2009.09.120
- Frey Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Biol R 75:583–609. https://doi.org/10.1128/mmbr. 00020-11
- Fukuda TTH, Helfrich EJN, Mevers E, Melo WGP, van Arnam EB, Andes DR, Currie CR, Pupo MT, Clardy J (2021) Specialized metabolites reveal evolutionary history and geographic dispersion of a multilateral symbiosis. ACS Cent Sci 7:292–299. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00978
- Gemperline E, Horn HA, Delaney K, Currie CR, Li L (2017) Imaging with mass spectrometry of bacteria on the exoskeleton of fungusgrowing ants. ACS Chem Biol 12:1980–1985. https://doi.org/10. 1021/acschembio.7b00038
- Ghorai S, Banik SP, Verma D, Chowdhury S, Mukherjee S, Khowala S (2009) Fungal biotechnology in food and feed processing. Food Res Int 42:577–587. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02. 019
- Ginzburg O, Whitford WG, Steinberger Y (2008) Effects of harvester ant (*Messor* spp.) activity on soil properties and microbial communities in a Negev Desert ecosystem. Biol Fertil Soils 45:165– 173. https://doi.org/10.1007/s00374-008-0309-z
- Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. J Biotechnol 261:169–176
- Godoy MFP, Victor SR, Bellini AM, Guerreiro G, Rocha WC, Bueno OC, Hebling MJA, Bacci M, Fátima M, Da Silva GF, Vieira PC, Fernandes JB, Pagnocca FC (2005) Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. J Bras Chem Soc 16:669–672. https://doi.org/10.1590/S0103-5053200500 0400031

- Goes AC, Kooij PW, Culot L, Bueno OC, Rodrigues A (2022) Distinct and enhanced hygienic responses of a leaf-cutting ant toward repeated fungi exposures. Ecol Evol 12:e9112. https://doi.org/ 10.1002/ece3.9112
- Goldstein SL, Klassen JL (2020) Pseudonocardia symbionts of fungusgrowing ants and the evolution of defensive secondary metabolism. Front Microbiol 11:621041. https://doi.org/10.3389/fmicb. 2020.621041
- Gómez-Díaz JS, Niño-Castro A, Valencia-Giraldo SM, Cotazo-Calambas KM (2022) Hygienic behavior and antimicrobial peptide expression of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera, Formicidae) to *Metharhizium anisopliae*. J Hymenopt Res 91:335–356. https://doi.org/10.3897/JHR.91.82381
- González-Medina M, Owen JR, El-Elimat T, Pearce CJ, Oberlies NH, Figueroa M, Medina-Franco JL (2017) Scaffold diversity of fungal metabolites. Front Pharmacol 8:180. https://doi.org/10.3389/ fphar.2017.00180
- González-Medina M, Prieto-Martínez FD, Naveja JJ, Méndez-Lucio O, El-Elimat T, Pearce CJ, Oberlies NH, Figueroa M, Medina-Franco JL (2016) Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. Future Med Chem 8:1399–1412. https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0079
- Guedes FLA, Attili-Angelis D, Pagnocca FC (2012) Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of Atta laevigata (Formicidae: Attini). Folia Microbiol 57:21–26. https://doi.org/ 10.1007/s12223-011-0081-6
- Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D (2009) Candicidin-producing Streptomyces support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus Escovopsis. Proc Natl Acad Sci USA 106:4742–4746. https://doi.org/10.1073/pnas.0812082106
- Hansen KA, Kim RR, Lawton ES, Tran J, Lewis SK, Deol AS, Van Arnam EB (2022) Bacterial associates of a desert specialist fungus-growing ant antagonize competitors with a nocamycin analog. ACS Chem Biol 17:1824–1830. https://doi.org/10.1021/ acschembio.2c00187
- Hawksworth DL, Lücking R (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol Spectr 5:79–95. https://doi.org/ 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
- Heine D, Holmes NA, Worsley SF, Santos ACA, Innocent TM, Scherlach K, Patrick EH, Yu DW, Murrell JC, Vieria PC, Boomsma JJ, Hertweck C, Hutchings MI, Wilkinson B (2018) Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. Nat Commun 9:2208. https://doi.org/10.1038/ s41467-018-04520-1
- Holmes NA, Innocent TM, Heine D, Al Bassam M, Worsley SF, Trottmann F, Patrick EH, Yu DW, Murrell JC, Schiøtt M, Wilkinson B, Boomsma JJ, Hutchings MI (2016) Genome analysis of two *Pseudonocardia phylotypes* associated with *Acromyrmex* leafcutter ants reveals their biosynthetic potential. Front Microbiol 7:2073. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02073
- Huff T, Kuball HG, Anke T (1994) 7-Chloro-4,6–dimethoxy-1 (3H)isobenzofurane and basidalin: antibiotic secondary metabolites from *Leucoagaricus carneifolia* Gillet (Basidiomycetes). Z Naturforsch C J Biosci 49:407–410. https://doi.org/10.1515/ znc-1994-7-803
- Hughes WOH, Thomsen L, Eilenberg J, Boomsma JJ (2004) Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium* anisopliae var. anisopliae. J Invertebr Pathol 85:46–53. https:// doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.005
- Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGT, Abeywickrama PD, Aluthmuhandiram JVS, Brahamanage RS, Brooks S, Chaiyasen A, Chethana KWT, Chomnunti P, Chepkirui C, Chuankid B, de Silva NI, Doilom M, Faulds C, Gentekaki E, Gopalan V, Kakumyan P, Harishchandra D, Hemachandran H, Hongsanan S, Karunarathna A, Karunarathna SC, Khan S,
Kumla J, Jayawardena RS, Liu JK, Liu N, Luangharn T, Macabeo APG, Marasinghe DS, Meeks D, Mortimer PE, Mueller P, Nadir S, Nataraja KN, Nontachaiyapoom S, O'Brien M, Penkhrue W, Phukhamsakda C, Ramanan US, Rathnayaka AR, Sadaba RB, Sandargo B, Samarakoon BC, Tennakoon DS, Siva R, Sriprom W, Suryanarayanan TS, Sujarit K, Suwannarach N, Suwunwong T, Thongbai B, Thongklang N, Wei D, Wijesinghe SN, Winiski J, Yan J, Yasanthika E, Stadler M (2019) The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. Fungal Divers 97:1–136. https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9

- Ilnuma H, Nakamura H, Naganawi H, Masuda T, Takano S, Takeuchi T, Umezawa H, IItaka Y, Obayashi A, (1983) Basidalin, a new antibiotic from basidiomycetes. J Antibiot 36:448–450. https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.448
- ITIS (2022) Integrated Taxonomic Information System. https://www. itis.gov/. Accessed 26 Sep 2022
- Iwai K, Iwamoto S, Aisaka K, Suzuki M (2009) Isolation of novel actinomycetes from spider materials. Actinomycetologica 23:8– 15. https://doi.org/10.3209/saj.SAJ230103
- Jiménez-Arreola BS, Aguilar-Ramírez E, Cano-Sánchez P, Morales-Jiménez J, González-Andrade M, Medina-Franco JL, Rivera-Chávez J (2020) Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: insights into mechanistic kinetics from *in vitro* and in silico studies. Bioorg Chem 101:103893. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893
- Jiménez-Gómez I, Barcoto MO, Montoya QV, Goes AC, Monteiro LSVE, Bueno OC, Rodrigues A (2021) Host susceptibility modulates escovopsis pathogenic potential in the fungiculture of higher Attine ants. Front Microbiol 12:673444. https://doi. org/10.3389/fmicb.2021.673444
- Johansson H, Dhaygude K, Lindström S, Helanterä H, Sundström L, Trontti K (2013) A metatranscriptomic approach to the identification of microbiota associated with the ant Formica exsecta. PLoS ONE 8:e0079777. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0079777
- Kaspari M, Stevenson BS, Shik J, Kerekes JF (2010) Scaling community structure: how bacteria, fungi, and ant taxocenes differentiate along a tropical forest floor. Ecology 91:2221–2226. https:// doi.org/10.1890/09-2089.1
- Kobmoo N, Mongkolsamrit S, Wutikhun T, Tasanathai K, Khonsanit A, Thanakitpipattana D, Luangsa-Ard JJ (2015) New species of *Ophiocordyceps unilateralis*, an ubiquitous pathogen of ants from Thailand. Fungal Biol 119:44–52. https://doi.org/10.1016/j. funbio.2014.10.008
- Kristiansen SM, Amelung W (2001) Abandoned anthills of *Formica* polyctena and soil heterogeneity in a temperate deciduous forest: morphology and organic matter composition. Eur J Soil Sci 52:355–363. https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.00390.x
- Kyle KE, Puckett SP, Mauricio Caraballo-Rodríguez A, Rivera-Chávez J, Samples RM, Earp CE, Raja HA, Pearce CJ, Ernst M, van der Hooft JJ, Adams ME, Oberlies NH, Dorrestein PC, Klassen JL, Balunas MJ (2023) *Trachymyrmex septentrionalis* ants promote fungus garden hygiene using *Trichoderma*-derived metabolite cues. bioRxiv 2022.11.12. https://doi.org/10.1101/2022.11.12. 516288
- Laakso J, Setälä H, Setala H (1998) Composition and trophic structure of detrital food web in ant nest mounds of *Formica aquilonia* and in the surrounding forest soil. Oikos 81:266. https:// doi.org/10.2307/3547047
- Leal IR, Silva PSD, Oliveira PS (2011) Natural history and ecological correlates of fungus-growing ants (Formicidae: Attini) in the neotropical cerrado savanna. Ann Entomol Soc Am 104:901–908. https://doi.org/10.1603/AN11067
- Li H, Sosa-Calvo J, Horn HA, Pupo MT, Clardy J, Rabeling C, Schultz TR, Currie CR (2018) Convergent evolution of complex structures for ant-bacterial defensive symbiosis in

🖉 Springer

fungus-farming ants. Proc Natl Acad Sci USA 115:10720–10725. https://doi.org/10.1073/pnas.1809332115

- Lindström S, Rowe O, Timonen S, Sundström L, Johansson H (2018) Trends in bacterial and fungal communities in ant nests observed with terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and next generation sequencing (NGS) techniques-validity and compatibility in ecological studies. PeerJ. https://doi.org/10.7717/peerj.5289
- Lindström S, Timonen S, Sundström L (2021) The bacterial and fungal community composition in time and space in the nest mounds of the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera: Formicidae). Microbiologyopen 10:e1201. https://doi.org/10.1002/ mbo3.1201
- Lindström S, Timonen S, Sundström L, Johansson H (2019) Ants reign over a distinct microbiome in forest soil. Soil Biol Biochem 139:107529. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107529
- Little AEF, Currie CR (2008) Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. Ecology 89:1216–1222. https://doi.org/10.1890/07-0815.1
- Little AEF, Currie CR (2007) Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. Biol Lett 3:501–504. https://doi.org/10.1098/rsb1.2007.0253
- Little AEF, Murakami T, Mueller UG, Currie CR (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. Biol Lett 2:12–16. https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0371
- López Arismendy E, Orduz Peralta S (2002) *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. Rev Colomb Biotecnol 4:71–78
- Lucas J, Bill B, Stevenson B, Kaspari M (2017) The microbiome of the ant-built home: the microbial communities of a tropical arboreal ant and its nest. Ecosphere 8:e1639. https://doi.org/10.1002/ecs2.1639
- Lucas JM, Madden AA, Penick CA, Epps MJ, Marting PR, Stevens JL, Fergus DJ, Dunn RR, Meineke EK (2019) Azteca ants maintain unique microbiomes across functionally distinct nest chambers. Proc R Soc B Biol Sci 286:20191026. https://doi.org/10.1098/ rspb.2019.1026
- Lugo AM, Crespo ME, Cafao M, Jofré L (2013) Hongos asociados con dos poblaciones de *Acromyrmex lobicornis* (Formicidae) de San Luis, Argentina. Bol Soc Argent Bot 48:5–15
- Luiso J, Kellner K, Matthews AE, Mueller UG, Seal JN (2020) High diversity and multiple invasions to North America by fungi grown by the northern-most *Trachymyrmex* and *Mycetomoellerius* ant species. Fungal Ecol 44:100878. https://doi.org/10. 1016/j.funeco.2019.100878
- Lupala AS, Oh SY, Park MS, Kim T, Yoo JS, Seelan JSS, Lim YW (2019) Co-occurrence patterns of wood-decaying fungi and ants in dead pines of South Korea. J Asia Pac Entomol 22:1154–1160. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.10.009
- Madden AA, Grassetti A, Soriano JAN, Starks PT (2013) Actinomycetes with antimicrobial activity isolated from paper wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) nests. Environ Entomol 42:703–710. https://doi.org/10.1603/EN12159
- Magnus P, Mansley TE (1999) Synthesis of the ABCD-rings of the insecticidal indole alkaloid nodulisporic acid. Tetrahedron Lett 40:6909–6912. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)01355-6
- Maksimova IA, Glushakova AM, Kachalkin AV, Chernov IY, Panteleeva SN, Reznikova ZI (2016) Yeast communities of *Formica* aquilonia colonies. Microbiology 85:124–129. https://doi.org/ 10.1134/S0026261716010045
- Małagocka J, Jensen AB, Eilenberg J (2017) Pandora formicae, a specialist ant pathogenic fungus: new insights into biology and taxonomy. J Invertebr Pathol 143:108–114. https://doi.org/10. 1016/j.jip.2016.12.007

- Mankowski ME, Morrell JJ (2004) Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. Mycologia 96:226–231. https://doi.org/10.1080/15572536.2005. 11832972
- Mans DR, Sairras S, Ganga D, Kartopawiro J (2016) Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs - insects. J Transl Sci 3:371–386. https://doi.org/10.15761/JTS.1000164
- Masiulionis VE, Pagnocca FC (2020) In vitro study of volatile organic compounds produced by the mutualistic fungus of leaf-cutter ants and the antagonist Escovopsis. Fungal Ecol 48:100986. https:// doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100986
- Mayer VE, Voglmayr H (2009) Mycelial carton galleries of Azteca brevis (Formicidae) as a multi-species network. Proc R Soc B Biol Sci 276:3265–3273. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0768
- Meena H, Siddhardha B (2019) Global scenario of fungal white biotechnology: past, present, and future. In: Yadav AN, Mishra S, Singh S, Gupta A (eds) Recent advancement in white biotechnology through fungi. Springer International Publishing, Cham, pp 537–571
- Menegatti C, Fukuda TTH, Pupo MT (2021) Chemical ecology in insect-microbe interactions in the neotropics. Planta Med 87:38– 48. https://doi.org/10.1055/a-1229-9435
- Middelhoven WJ, Fonseca A, Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC (2003) Cryptococcus haglerorum, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant Atta sexdens. Antonie Van Leeuwenhoek 83:167–174. https://doi.org/ 10.1023/A:1023384830802
- Miranda Duarte AP (2013) Fungos negros derivados de *Atta* spp.: diversidad e fatores de virulencia. Dissertation, Universidad Estatal Paulista Júlio de Mesquita Filho
- Montoya QV, Martiarena MJS, Bizarria R, Gerardo NM, Rodrigues A (2021) Fungi inhabiting attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Luteomyces* and *Sympodi*orosea gens. nov. IMA Fungus 12:23. https://doi.org/10.1186/ s43008-021-00078-8
- Montoya QV, Meirelles LA, Chaverri P, Rodrigues A (2016) Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. Antonie Van Leeuwenhoek 109:633–651. https://doi.org/10.1007/s10482-016-0666-9
- Moreau CS (2020) Symbioses among ants and microbes. Curr Opin Insect Sci 39:1–5. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.002
- Moreno LF, Mayer V, Voglmayr H, Blatrix R, Benjamin Stielow J, Teixeira MM, Vicente VA, de Hoog S (2019) Genomic analysis of ant domatia-associated melanized fungi (Chaetothyriales, Ascomycota). Mycol Prog 18:541–552. https://doi.org/10.1007/ s11557-018-01467-x
- Mueller UG, Dash D, Rabeling C, Rodrigues A (2008) Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. Evolution 62:2894–2912. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646. 2008.00501.x
- Mueller UG, Ishak HD, Bruschi SM, Smith CC, Herman JJ, Solomon SE, Mikheyev AS, Rabeling C, Scott JJ, Cooper M, Rodrigues A, Ortiz A, Brandão CRF, Lattke JE, Pagnocca FC, Rehner SA, Schultz TR, Vasconcelos HL, Adams RMM, Bollazzi M, Clark RM, Himler AG, LaPolla JS, Leal IR, Johnson RA, Roces F, Sosa-Calvo J, Wirth R, Bacci M (2017) Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. Mol Ecol 26:6921–6937. https://doi.org/10.1111/mec.14431
- Nair MSR, Hervey A (1979) Structure of lepiochlorin, an antibiotic metabolite of a fungus cultivated by ants. Phytochemistry 18:326–327. https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80085-0
- Nascimento MO, Teles Tenório AC, Sarmento RA, de Melo R, CC, della Lucia TMC, Dias Amaral K, Souza DJ, (2022) Soil actinobacteria inhibit antagonistic fungi of leafcutter ant colonies. J Basic Microbiol 62:63–73. https://doi.org/10.1002/jobm.202100476

- Nepel M, Voglmayr H, Blatrix R, Longino JT, Fiedler K, Schönenberger J, Mayer VE (2016) Ant-cultivated Chaetothyriales in hollow stems of myrmecophytic *Cecropia* sp. trees – diversity and patterns. Fungal Ecol 23:131–140. https://doi.org/10.1016/j. funeco.2016.07.007
- Nepel M, Voglmayr H, Schönenberger J, Mayer VE (2014) High diversity and low specificity of Chaetothyrialean fungi in carton galleries in a neotropical ant-plant association. PLoS ONE 9:e0112756. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112756
- O'Brien J, Wright GD (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. Curr Opin Biotechnol 22:552–558. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.010
- Offenberg J, Damgaard C (2019) Ants suppressing plant pathogens: a review. Oikos 128:1691–1703. https://doi.org/10.1111/oik.06744
- Offenberg J, Jensen IC, Hansen RR (2022) Combatting plant diseases with ant chemicals: a review and meta-analysis. J Appl Ecol 59:25–38. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14017
- Oh DC, Poulsen M, Currie CR, Clardy J (2009) Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. Nat Chem Biol 5:391–393. https://doi.org/10.1038/nchembio.159
- OMS (2020) Resistencia a los antimicrobianos. https://www.who. int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. Accessed 12 May 2023
- Orivel J, Leroy C (2010) The diversity and ecology of ant gardens (Hymenoptera: Formicidae; Spermatophyta: Angiospermae). Myrmecol News 14:73–85
- Ortega HE, Lourenzon VB, Chevrette MG, Ferreira LLG, Alvarenga RFR, Melo WGP, Venâncio T, Currie CR, Andricopulo AD, Bugni TS, Pupo MT (2021) Antileishmanial macrolides from ant-associated *Streptomyces* sp. ISID311. Bioorg Med Chem 32:116016. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116016
- Ortiz A, Orduz S (2001) *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leafcutting ant *Atta cephalotes*. Mycopathologia 150:53–60. https:// doi.org/10.1023/A:1010843413085
- Pagnocca FC, Legaspe MFC, Rodrigues A, Ruivo CCC, Nagamoto NS, Bacci M, Forti LC (2010) Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. Int J Syst Evol Microbiol 60:1454–1459. https://doi.org/10.1099/ijs.0.015727-0
- Pagnocca FC, Rodrigues A, Nagamoto NS, Bacci M (2008) Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. Antonie Van Leeuwenhoek 94:517–526. https://doi.org/10.1007/ s10482-008-9268-5
- Parmentier T, De Laender F, Bonte D (2020) The topology and drivers of ant–symbiont networks across Europe. Biol Rev 95:1664– 1688. https://doi.org/10.1111/brv.12634
- Pathak A, Kett S, Marvasi M (2019) Resisting antimicrobial resistance: lessons from fungus farming ants. Trends Ecol Evol 34:974–976. https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.007
- Pereira JS, Costa RR, Nagamoto NS, Forti LC, Pagnocca FC, Rodrigues A (2016) Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences. Fungal Ecol 21:68–75. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.03.004
- Pham JV, Yilma MA, Feliz A, Majid MT, Maffetone N, Walker JR, Kim E, Cho HJ, Reynolds JM, Song MC, Park SR, Yoon YJ (2019) A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. Front Microbiol 10:1404. https:// doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404
- Pietrobon T de C, Kooij PW, Montoya QV, Rodrigues A (2022) *Escovopsioides nivea* is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops. Fungal Ecol 56:101140. https://doi.org/10. 1016/j.funeco.2022.101140
- Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FST, Wallace Cleland W, Weimer PJ, Currie CR (2009) Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants.

Science 326:1120–1123. https://doi.org/10.1126/science. 1173036

- Poulsen M, Cafaro MJ, Erhardt DP, Little AEF, Gerardo NM, Tebbets B, Klein BS, Currie CR (2009) Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Environ Microbiol Rep 2:534–540. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x
- Poulsen M, Oh DC, Clardy J, Currie CR (2011) Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. PLoS ONE 6:e16763. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016763
- Pringle EG, Moreau CS (2017) Community analysis of microbial sharing and specialization in a Costa Rican ant – plant – hemipteran symbiosis. P R Soc B 284. https://doi.org/10. 1098/rspb.2016.2770
- Promnuan Y, Promsai S, Pathom-Aree W, Meelai S (2021) Apis andreniformis associated actinomycetes show antimicrobial activity against black rot pathogen (Xanthomonas campestris pv. campestris). PeerJ 9. https://doi.org/10.7717/peerj.12097
- Quan Y, Ahmed SA, Menezes da Silva N, Al-Hatmi AMS, Mayer VE, Deng S, Kang Y, Sybren de Hoog G, Shi D (2021) Novel black yeast-like species in Chaetothyriales with ant-associated life styles. Fungal Biol 125:276–284. https://doi.org/10.1016/j. funbio.2020.11.006
- Ramadhar TR, Beemelmanns C, Currie CR, Clardy J (2014) Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. J Antibiot 67:53–58. https:// doi.org/10.1038/ja.2013.77
- Reis BM dos S, Silva A, Alvarez MR, de Oliveira TB, Rodrigues A (2015) Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). Fungal Biol 119:1170–1178. https://doi. org/10.1016/j.funbio.2015.09.001
- Reynolds HT, Currie CR (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. Mycologia 96:955–959. https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832895
- Ribeiro MMR, Amaral KD, Seide VE, Souza BMR, Della Lucia TMC, Kasuya MCM, De Souza DJ (2012) Diversity of fungi associated with Atta bisphaerica (Hymenoptera: Formicidae): the activity of Aspergillus ochraceus and Beauveria bassiana. Psyche 2012:389806. https://doi.org/10.1155/2012/389806
- Ríos-Casanova L (2014) Biodiversity of ants in Mexico. Rev Mex Biodivers 85:392–398. https://doi.org/10.7550/rmb.32519
- Rocha SL, Evans HC, Jorge VL, Cardoso LAO, Pereira FST, Rocha FB, Barreto RW, Hart AG, Elliot SL (2017) Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a trojan-horse management strategy. R Soc Open Sci 4. https://doi.org/10.1098/rsos.160628
- Rodrigues A, Bacci M, Mueller UG, Ortiz A, Pagnocca FC (2008) Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. Microb Ecol 56:604–614. https://doi.org/10.1007/s00248-008-9380-0
- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M, Pagnocca FC (2009) Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. Antonie Van Leeuwenhoek 96:331–342. https://doi.org/10.1007/ s10482-009-9350-7
- Rodrigues A, Mueller UG, Ishak HD, Bacci M, Pagnocca FC (2011) Ecology of microfungal communities in gardens of fungusgrowing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. FEMS Microbiol Ecol 78:244–255. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941. 2011.01152.x
- Rodrigues A, Pagnocca F, Bueno O, Pfenning LH, Bacci M (2005a) Assessment of microfungi in fungus gardens free of the

leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 46:329–334

- Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci M, Hebling MJA, Bueno OC, Pfenning LH (2005b) Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with Atta sexdens rubropilosa nests. Folia Microbiol 50:421. https://doi.org/10.1007/BF02931424
- Rodrigues A, Passarini MRZ, Ferro M, Nagamoto NS, Forti LC, Bacci M, Sette LD, Pagnocca FC (2014) Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. J Basic Microbiol 54:1186–1196. https://doi.org/10.1002/jobm.201200458
- Rojas Fernández P (2001) Las hormigas del suelo en México: Diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). Acta Zool Mex 189–238. https://doi.org/10.21829/azm.2001. 8401851
- Ruiz-González MX, Malé PJG, Leroy C, Dejean A, Gryta H, Jargeat P, Quilichini A, Orivel J (2011) Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants. Biol Lett 7:475–479. https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0920
- Russell JA, Sanders JG, Moreau CS (2017) Hotspots for symbiosis: function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecol News 24:43–69
- Sakolrak B, Blatrix R, Sangwanit U, Arnamnart N, Noisripoom W, Thanakitpipattana D, Buatois B, Hossaert-McKey M, Kobmoo N (2018) Ant-produced chemicals are not responsible for the specificity of their Ophiocordyceps fungal pathogens. Fungal Ecol 32:80–86. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.11.005
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, Reynolds SE, Samuels RI (2004) Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. FEMS Microbiol Lett 239:319–323. https://doi.org/10.1016/j. femsle.2004.09.005
- Scherlach K, Graupner K, Hertweck C (2013) Molecular bacteriafungi interactions: effects on environment, food, and medicine. Annu Rev Microbiol 67:375–397. https://doi.org/10.1146/annur ev-micro-092412-155702
- Schoenian I, Spiteller M, Ghaste M, Wirth R, Herz H, Spiteller D (2011) Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. Proc Natl Acad Sci USA 108:1955–1960. https://doi.org/10.1073/ pnas.1008441108
- Schueffler A, Anke T (2014) Fungal natural products in research and development. Nat Prod Rep 31:1425–1448. https://doi.org/10. 1039/c4np00060a
- Seabrooks L, Hu L (2017) Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. Acta Pharm Sin B 7:409–426. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.001
- Seifert KA, Samson RA, Chapela IH (1995) Escovopsis aspergilloides, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. Mycologia 87:407–413. https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026546
- Seipke RF, Barke J, Brearley C, Hill L, Yu DW, Goss RJM, Hutchings MI (2011) A single Streptomyces symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. PLoS ONE 6:4–11. https://doi.org/10.1371/journ al.pone.0022028
- Seipke RF, Barke J, Ruiz-Gonzalez MX, Orivel J, Yu DW, Hutchings MI (2012) Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 101:443–447. https://doi.org/10.1007/s10482-011-9621-y
- Selim MSM, Abdelhamid SA, Mohamed SS (2021) Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. J Genet Eng Biotechnol 19:72. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9
- Sen R, Ishak HD, Estrada D, Dowd SE, Hong E, Mueller UG (2009) Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing

ants. Proc Natl Acad Sci USA 106:17805–17810. https://doi.org/ 10.1073/pnas.0904827106

- Siedlecki I, Gorczak M, Okrasińska A, Wrzosek M (2021) Chance or necessity—the fungi co–occurring with *Formica polyctena* ants. Insects 12:204. https://doi.org/10.3390/insects12030204
- Singh SB, Ondeyka JG, Schleift WA, Felock P, Hazuda DJ (2003) Chemistry and structure-activity relationship of HIV-1 integrase inhibitor integracide B and related natural products. J Nat Prod 66:1338–1344. https://doi.org/10.1021/np030211s
- Sit CS, Ruzzini AC, van Arnam EB, Ramadhar TR, Currie CR, Clardy J, Sit CS, Ruzzini AC, van Arnam EB, Ramadhar TR, Currie CR (2015) Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants. Proc Natl Acad Sci USA 112:E6717. https://doi.org/10.1073/pnas. 1521903112
- Smetanina OF, Kalinovsky AI, Khudyakova YV, Pivkin MV, Dmitrenok PS, Fedorov SN, Ji H, Kwak J-Y, Kuznetsova TA (2007) Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* Biourge. J Nat Prod 70:906–909. https://doi. org/10.1021/np060396d
- Snyder SR, Crist TO, Friese CF (2002) Variability in soil chemistry and arbuscular mycorrhizal fungi in harvester ant nests: the influence of topography, grazing and region. Biol Fertil Soils 35:406–413. https://doi.org/10.1007/s00374-002-0487-z
- Sokolova YY, Fuxa JR (2008) Biology and life-cycle of the microsporidium *Kneallhazia solenopsae* Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., from the fire ant *Solenopsis invicta*. Parasitology 135:903–929. https://doi.org/10.1017/S003118200800440X
- Sosa-Calvo J, Schultz TR, JeŠovnik A, Dahan RA, Rabeling C (2018) Evolution, systematics, and natural history of a new genus of cryptobiotic fungus-growing ants. Syst Entomol 43:549–567. https://doi.org/10.1111/syen.12289
- Sousa KKA, Catalani GC, Gianeti TMR, Camargo RS, Caldato N, Ramos VM, Forti LC (2020) A volatile semiochemical released by the fungus garden of leaf-cutting ants. Fla Entomol 103:1. https://doi.org/10.1653/024.103.0401
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol Biol Evol 38:3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
- Tarsa C, McMillan A, Warren RJ (2018) Plant pathogenic fungi decrease in soil inhabited by seed-dispersing ants. Insect Soc 65:315–321. https://doi.org/10.1007/s00040-018-0618-7
- Van Arnam EB, Currie CR, Clardy J (2018) Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. Chem Soc Rev 47:1638–1651. https://doi.org/10.1039/c7cs00340d
- Van Bael SA, Fernández-Marín H, Valencia MC, Rojas EI, Wcislo WT, Herre EA (2009) Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. P R Soc B 276:2419–2426. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0196
- Van Bael SA, Seid MA, Wcislo WT (2012) Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (Atta). Ecol Entomol 37:318–321. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2012. 01364.x
- Van Borm S, Billen J, Boomsma JJ (2002) The diversity of microorganisms associated with Acromyrmex leafcutter ants. BMC Evol Biol 2:9. https://doi.org/10.1186/1471-2148-2-9
- Van Moll L, De Smet J, Cos P, Van Campenhout L (2021) Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review.

Crit Rev Microbiol 47:562–579. https://doi.org/10.1080/10408 41X.2021.1907302

- Vander Meer R (2012) Ant interactions with soil organisms and associated semiochemicals. J Chem Ecol 38:728–745. https://doi.org/ 10.1007/s10886-012-0140-8
- Vieira AS, Morgan ED, Drijfhout FP, Camargo-Mathias MI (2012) Chemical composition of metapleural gland secretions of fungusgrowing and non-fungus-growing ants. J Chem Ecol 38:1289– 1297. https://doi.org/10.1007/s10886-012-0185-8
- Voglmayr H, Mayer V, Maschwitz U, Moog J, Djieto-Lordon C, Blatrix R (2011) The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. Fungal Biol 115:1077–1091. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.11. 006
- Wagner D, Brown MJF, Gordon DM (1997) Harvester ant nests, soil biota and soil chemistry. Oecologia 112:232–236. https://doi.org/ 10.1007/s004420050305
- Wang B, You J, King JB, Cai S, Park E, Powell DR, Cichewicz RH (2014) Polyketide glycosides from *Bionectria ochroleuca* inhibit *Candida albicans* biofilm formation. J Nat Prod 77:2273–2279. https://doi.org/10.1021/np500531j
- Wang C, Wang G, Wu P, Rafique R, Zi H, Li X, Luo Y (2017) Effects of ant mounds on the plant and soil microbial community in an alpine meadow of Qinghai-Tibet plateau. Land Degrad Dev 28:1538–1548. https://doi.org/10.1002/ldr.2681
- Wang Y, Mueller UG, Clardy J (1999) Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. J Chem Ecol 25:935–941. https://doi.org/10.1023/A:1020861221126
- Weber NA (1957) Fungus-growing ants and their fungi: Cyphomyrmex costatus. Ecology 38:480. https://doi.org/10.2307/1929893
- Weißflog A (2001) Freinestbau von Ameisen (Hymenoptera: Formicidae) in der Kronenregion feuchttropischer Wälder Südostasiens : Bestandsaufnahme und Phänologie, Ethoökologie und funktionelle Analyse des Nestbaus. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität
- Worsley S, Innocent T, Heine D, Murrell C, Yu D, Wilkinson B, Hutchings M, Boomsma J, Holmes N (2018) Symbiotic partnerships and their chemical interactions in the leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecol News 27:59–47
- Wu Y, Liu Y, Yu J, Xu Y, Chen S (2022) Observation of the antimicrobial activities of two actinomycetes in the harvester ant *Messor orientalis*. Insects 13:691. https://doi.org/10.3390/insec ts13080691
- Yan S, Li S, Wu W, Zhao F, Bao L, Ding R, Gao H, Wen H-A, Song F, Liu H-W (2011) Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests. Chem Biodivers 8:1689–1700. https://doi.org/10.1002/cbdv.201100026
- Yek SH, Mueller UG (2011) The metapleural gland of ants. Biol Rev 86:774–791. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00170.x
- Yek SH, Nash DR, Jensen AB, Boomsma JJ (2012) Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. P R Soc B 279:4215–4222. https://doi.org/10.1098/ rspb.2012.1458
- Zhang Z, Wei Z, Wang JJ, Xiao R, Meng Y, Wu H, Lyu X (2018) Ants alter molecular characteristics of soil organic carbon determined by pyrolysis-chromatography/mass spectrometry. Appl Soil Ecol 130:91–97. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.020



RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

# Harnessing Molecular and Bioactivity Network Analysis to Prioritize Antibacterial Compound Isolation From Ant-Associated Fungi

Ángel S. Aguilar-Colorado<sup>1</sup> 💿 | Jesús Morales-Jiménez<sup>2</sup> 💿 | José Rivera-Chávez<sup>1</sup> 💿

<sup>1</sup>Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Ciudad de México, Mexico | <sup>2</sup>Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, Mexico

Correspondence: José Rivera-Chávez (jrivera@iquimica.unam.mx)

Received: 10 September 2024 | Revised: 5 December 2024 | Accepted: 7 January 2025

Funding: This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IA207422, IN224424) and CONAHCyT (0224747, 885837, CF-2019-263977).

Keywords: ant | anthill | antibacterial compound | Atta | bioactivity network | cloud forest fungi | molecular network | Solenopsis

### ABSTRACT

**Introduction:** Antimicrobial resistance is a global public health problem that requires the development of new bioactive compounds. In this context, metabolomic analyses can expedite the research of fungal metabolites as a valuable resource.

**Objectives:** To investigate the metabolic profiles and isolate antibacterial compounds from micromycetes associated with Mexican cloud forest ants by utilizing network analysis of their chemical and bioactivity data.

**Material and Methods:** 248 fungal strains isolated from six ant's species, soil of their anthills, and soil of the surroundings were evaluated for their in vitro inhibition growth of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; subsequently, their metabolites were dereplicated and analyzed by molecular networking and compound activity mapping from spectrometric data. Prioritization of some fungi for isolation of their major constituents was performed, and their structures were established by spectroscopic and spectrometric analysis and their bioactivity determined.

**Results:** From the fungal collection, 15 secondary metabolites (1–15) were dereplicated, and 10 compounds (16–25), including the new (*E*)-tridec-7-ene-3,5,6,10-tetraol (25), were isolated from *Ascomycetes* of *Trichoderma*, *Cladosporium*, and *Clonostachys* genera. Compounds 16–18 stood out for being bioactive. This study is the first report of antibacterial activity against *A. baumannii* for the tricyclic pyridin-2-ones deoxy-PF1140 (16) and PF1140 (17), with minimum inhibitory concentration of 50 µg/mL. **Conclusion:** Network analysis and dereplication proved effective in bioprospecting for antibacterial compounds, offering valu-

able insights into the chemical diversity of cloud forest soil fungi and their potential applications. Moreover, this study broadens the knowledge of fungal secondary metabolites linked to leafcutter, fire, and warrior ants.

## 1 | Introduction

Estimates of the number of species on Earth place the fungi kingdom among the richest [1]. However, despite their biological diversity and cosmopolitan presence, the chemical constituents of most fungal species remain unexplored, and, consequently, the exploitation of their chemical diversity is limited [2]. Natural

products possess an incomparable variety of chemical structures with useful biological activities in medicine and agronomy [3, 4]. In particular, fungal secondary metabolites are a promising source of drugs or structural prototypes, particularly in the development of antimicrobial, immunosuppressive, antidiabetic, and anticancer treatments, among other applications [3, 5]. Their metabolites are advantageous because of their

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<sup>@</sup> 2025 The Author(s). Phytochemical Analysis published by John Wiley & Sons Ltd.

drug-like physicochemical properties, high structural diversity, and unique scaffolds [6, 7]. Furthermore, fungi are a remarkable source of antibiotics given the defense or communication molecules they synthesize to survive in their environments [8, 9].

Today, the development of resistance to antibiotics by pathogenic bacteria is one of the greatest threats to global public health due to the limited availability of treatments. The most concerning multiresistant bacteria are those causing the highest number and more severe infections, for example, Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter spp., collectively referred to as the ESKAPE group, and are included in the priority attention list of the World Health Organization (WHO) [10, 11]. In this context, fungi associated with less explored environments can be exploited through bioprospecting studies to discover antibacterial compounds as has been done, for example, with cenotes or the deep seabed [12, 13]. Even the soil, hosting strains of Penicillium, Cephalosporin, and Aspergillusrenowned for their ability to synthesize antibiotics-remains a largely unexplored resource with untapped potential awaiting to be discovered [14]. The diversity of fungi in soil has been well documented, and it is known to be dependent on climatic factors, except for mycorrhizae, which are linked to plant richness [15]. In this context, ants and their nests represent an understudied soil environment, rich in fungal and chemical diversity, that gaps investigation for new antibiotic discoveries [16, 17]. Among the ~14,000 ant species known worldwide, in terms of fungal diversity the most studied belong to the Attini tribe. The isolated filamentous and yeast-like fungi are summarized in 360 species, from 173 genera, being Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Candida, and Cryptococcus the most isolated genera, for which chemical information available is limited, but highlights the ability of these microorganisms to synthesize complex structures whose ecological role is unknown [18, 19].

In this research, filamentous fungi isolated from ants' bodies (entomogenous) and soil of their nests within a Mexican cloud forest (tropical montane cloud forest) were fermented and tested against multidrug-resistant *A. baumannii* and one hypervirulent strain of *K. pneumoniae*, aiming to prioritize the most promising fungal strains for isolation of antibacterial molecules [20–22]. These pathogens are of particular interest for their presence in clinical areas, food, and animals, both domestic and livestock [11, 23, 24].

The prioritization process was guided by molecular network analysis and compound activity mapping, which facilitated the identification of structural similarities within the chemical compositions and the presumptive identification of bioactive molecules [25, 26]. This approach led to the identification of 15 molecules and the isolation of 10 compounds from six ascomycetes. Among the isolates, a new chemical entity is reported, alongside several metabolites exhibiting antimicrobial, phytotoxic, cytotoxic against human cancer lines,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and others. Notably, a pair of tricyclic pyridin-2-ones showed promising antibacterial activity against a multiresistant *A. baumannii*.

Furthermore, network analysis provided a comparative framework for understanding the chemical diversity within fungal communities in ant nests, their associated entomogenous fungi, and nearby soil. Compound activity mapping revealed the potential diversity of bioactive compounds in the collection, underscoring the value of this integrated approach in discovering novel antimicrobial agents.

## 2 | Materials and Methods

## 2.1 | Instruments

High-resolution mass spectrometry (HRMS) by direct analysis in real time (DART) in positive mode were acquired on an JEOL AccuTOF JMS-T100LC (Akishima, Japan) equipment with time-of-flight analyzer (TOF); samples were dissolved in methanol. One- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectra <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC, and NOESY were acquired at room temperature on Bruker Avance III 400-MHz equipment or Bruker Avance 700-MHz (Billerica, Massachusetts, USA) equipment. Experiments were recorded in the deuterated solvents chloroform, methanol, acetone, or dimethylsulfoxide (DMSO). RMN spectra were referenced to the residual solvent signal. Optical rotation of the samples dissolved in methanol was determined in a PerkinElmer 343 polarimeter (Waltham, Massachusetts, USA).

Metabolomic analyses were performed in a high-performance liquid chromatography (HPLC) system coupled to a HRMS<sup>2</sup> with electrospray ionization (ESI) and quadrupole-TOF (QTOF) analyzers, as well as an ultraviolet (UV) and visible light absorption detector by photodiode array (PDA), Agilent model G6530BA (Santa Clara, California, USA). Flash chromatography (FC) was performed in a BÜCHI instrument model Pure C-810 with PDA detector (Flawil, Sweden). Preparative or semipreparative liquid chromatography was carried out in a HPLC Waters (Milford, Massachusetts, USA), which consists of an autosampler, a PDA detector (model 2998), and an evaporative light scattering detector (2424; ELS), as well as a quaternary gradient pump (2535); the control of the equipment, the acquisition, and management of data were carried out with Empower 3.0.

For antibacterial assays, a New Brunswick Scientific Excella E24 shaker (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), a BioTek Cytation 5 microplate reader (Agilent, Santa Clara, California, USA), and a MULTISKAN SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) microplate reader were used.

#### 2.2 | Solvents and Reagents

The solvents used in the macerations and liquid/liquid separations were of industrial grade, properly distilled. The solvents for chromatographic separations were HPLC grade, acetonitrile purchased from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA), methanol from Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, USA), and formic acid from Fermont (Monterrey, Nuevo León, México). For spectrometric analysis, acetonitrile of such grade from Honeywell (Charlotte, North Carolina, USA) and water Milli-Q grade were employed. Of reactive grade, DMSO (Fermont), gentamicin sulfate (GOLDBIO; St Louis, Missouri, USA), and colistin sulfate (Sigma-Aldrich) were used. The potato dextrose (PD) agar and broth were purchased from MCD LAB (San Jacinto Amilpas, Oaxaca, México) and the Muller Hinton (MH) broth from Condalab (Madrid, Spain); all growth media were prepared with distilled water. The cereal for solid cultures was Cheerios honey from Nestle (Vevey, Switzerland). Deuterated solvents were purchased from Sigma-Aldrich.

## 2.3 | Study Area and Collection of Soil and Ants

Ant nests were selected from cloud forest reserve and certain disturbed areas located in the municipalities of Xalapa de Enriquez, Coatepec, and Teocelo, Veracruz, Mexico (Table S1). The collection was open to any ant and their nest found at ground level along roads or paths at the surveyed locations. From each active anthill, two 40-mL soil samples were collected, one from the area near the entrance, transit area, or mound and the other 5 m from it, where ant activity was not observed, without considering the leaf litter and from the surface to a depth of 10 cm. The interior of two nests was also sampled, in which case soil was collected from the walls of a tunnel that was found by digging horizontally from a trench next to a mound. The soil was kept in airtight containers, protected from light, and refrigerated at 0°C-5°C, during fieldwork until cultivation. The shovels and spatulas used were washed with water and sterilized by rinsing with absolute ethanol before each harvesting [27, 28]. Additionally, ants of indistinct caste were collected from each nest and maintained in absolute ethanol for taxonomic determination. A second sample of ants was kept alive in an airtight container, protected from light, and refrigerated for less than 12h until processing. The insects were treated according to the capture and conservation techniques described in the literature [29].

The ants were identified to species level according to morphological keys, and the specimens were deposited in the Entomological Collection IEXA, in Xalapa, Veracruz, Mexico, with the accession identifier IEXA-2024-IM12.

### 2.4 | Fungal Strains Isolation and Identification

For soil samples, a dilution technique limited to the isolation of the filamentous fungal population capable of growing on PD agar medium was applied, as designed based on previously reported methods [27, 28]. A suspension 1:10 w/v in sterile distilled water was prepared from each sample and serially diluted 1:10v/v four times. Then, 350 µL of the three least concentrated suspensions were plated with a replicate in 10-cm-diameter Petri dishes with PD agar supplemented with gentamicin at 150µg/mL. The cultures were incubated for several weeks at room temperature under normal light-dark cycles, and axenic morphotypes were obtained for each sample by consecutive transfers. As adapted from a published procedure, entomogenous fungi from ants required sterilization of their exoskeleton by immersion in absolute ethanol for 120-150s and rinsing with sterile distilled water [30]. Dried specimens were kept refrigerated. For culture, 9-90 ants from each nest were crushed in 350 or  $500 \,\mu\text{L}$  of sterile distilled water. Subsequently, the suspension was plated on PD agar supplemented with gentamicin. Axenic morphotypes were obtained as previously stated. In this research, morphotypes

refer to a classification based on macroscopic characteristics of the fungus strains such as size, elevation, edge, color, mycelial type, presence of exudates, and shape of their colonies [31, 32]. All morphotypes were assigned an alphanumeric key from IQ-751 to 1538 and deposited in a fungal collection of the research group (Tables S2 and S3).

Taxonomic determination of selected fungi was performed by molecular sequencing of the internal transcribed spacer region (ITS) of each morphotype. Sequences were deposited in GenBank database (Table S11). DNA extraction, amplification, sequencing, and alignment analysis for identification was performed as described by Martínez-Aldino et al. [33].

#### 2.5 | Fungal Cultivation and Extraction

For screening purposes, all cultures were performed on a small scale (Table S4). First, a liquid culture of each morphotype was prepared in 5mL of PD broth in hermetically sealed plastic tubes, inoculated with a 1 cm<sup>2</sup> piece of agar with mycelium, and incubated for ~11 days under orbital shaking at 100 rpm, with normal light-dark periods at room temperature. Subsequently, the liquid culture was transferred to a solid media (3g of cereal Cheerios) contained in plastic tubes or 25-mL Erlenmeyer flasks and incubated for ~25 days under static conditions. After fermentation process, all samples were extracted by maceration with shaking at 100 rpm for 24 h with a 50:25:25 mixture of ethyl acetate-methanol-dichloromethane. The extraction solvent was filtered through degreased cotton and brought to dryness to generate the extract [34, 35]. Additionally, control culture extracts were obtained from the growth mediums. For chemical studies, the culture process was scaled up to medium size. It was carried out following the procedure described for the small version but adjusting the necessary to a variable number of cultures with 9g of cereal in 250-mL Erlenmeyer flasks (Table S12). The extraction process was performed adjusting the solvent volume.

### 2.6 | Untargeted Metabolomic Studies

The extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 2 mg/ mL and analyzed by HPLC-QTOF-HRMS<sup>2</sup>. Chromatographic separations were performed on a Gemini phase NX-C<sub>18</sub> column (2×75mm, particle size 3µm) Phenomenex (Torrance, California, USA) at 30°C. The mobile phase, at a flow rate of 0.4 mL/min, consisted of a mixture of acetonitrile and 0.1% water with formic acid using a gradient that started with a linear increase from 15% to 100% acetonitrile in 8 min and was maintained at 100% acetonitrile for 1.5 min before returning to initial conditions. The electrospray ionization (ESI+) source was operated in positive mode. Nitrogen at 275°C and 300°C, respectively, was used as auxiliary and envelope gas. The capillary voltage was 4.5 kV, and the nozzle voltage was 1 kV. Spectra were acquired with the analyzer in full scan mode over a range m/z100 to 2500, and for tandem analysis, the two most abundant precursors per cycle were selected and fragmented by collisionactivated dissociation at a normalized energy of 30 eV [33, 35].

Classical molecular networks were obtained with the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), and

their construction is based on the similarity of the fragmentation patterns of precursor ions along the total ion chromatograms of the extract collection [36]. Molecular networks are graphical representations of chemical diversity detected by HRMS<sup>2</sup>, and in the classical version, spectrometric data are grouped between samples using an algorithm called MSCluster [37]. Likewise, the nodes of the networks were dereplicated by comparing their consensus fragmentation patterns against information in the platform database; dereplication refers to the putative identification of known compounds [36]. The tandem mass spectra were processed with the ProteoWizard MSConvert Version 3 program to annotate the peaks using the Vendor algorithm and transform the files to the extension mzML [38]. 248 spectra of filamentous fungi were uploaded to the GNPS server, and classical networks were constructed with the basic parameters of 0.02 Da as the mass tolerance of the precursor ion and fragment ions, 0.7 as the minimum cosine score, a minimum of six fragment ions to connect two consensus spectra, 1999 Da as the maximum difference of the precursor ion between two neighboring nodes, a maximum of 10 connections per node, two as the minimum cluster size, and 100 as the maximum number of nodes in a connected network. The cosine score, or cosine similarity, is a metric used to quantify the similarity between two mass spectra. It ranges from 0 to 1, where 0 indicates no similarity (completely different spectra) and 1 indicates identical spectra. For the library search, three was initially selected as the minimum number of tandem mass spectrometry (MS<sup>2</sup>) fragments to share with the reference spectrum, as well as a minimum cosine similarity of 0.7. Before constructing the network, signals from the growth medium extracts and DMSO were subtracted to eliminate background noise and ensure the specificity of the detected compounds. The networks were mapped according to the origin of the morphotypes. Visualization of networks was performed in Cytoscape 3.10.3 [39].

The GNPS dereplication of the consensus nodes was manually verified for each spectrometric acquisition, and the spectrometric data of identified molecules were also searched in MassBank [40]. For identification of a compound, the exact mass of the precursor ion had to match with a variance of less than 5.1 ppm, a mass difference of less than 0.003; at least 5 fragments were shared with the reference spectrum; and the cosine similarity among spectra had to be greater than 0.7. In addition, the libraries were limited to Class 1 records, performed with ESI<sup>+</sup> and from authentic samples indexed; the spectrometric information of the Class 1 records comes from samples that have been peer-reviewed for integration into the platform.

Compound activity mapping was performed using the NP Analyst platform. This analysis uses scores based on Pearson correlation coefficients and arithmetic means to correlate HRMS<sup>2</sup> and bioactivity data from a group of samples. It facilitates the putative identification of m/z ratios associated with biological activity. The resulting graphical output is a bioactivity network, showing the presumed bioactive m/z ratios and the extracts in which they were identified [25]. Only the results of bacterial growth inhibition of *A. baumannii* were considered in this analysis. The inhibition percentages were normalized between 0 and 1 for each replicate. Spectrometric data consisted of the classical molecular network generated by GPNS. The cutoff value of

the activity and clustering score was 0.25 and 0.1, respectively, for network visualization. The network was edited and visualized in Cytoscape 3.10.3, as well as on the NP Analyst website.

## 2.7 | Compound Isolation

Primary fractionation was performed by liquid–liquid extraction. Each extract was dissolved in the minimum necessary volume (120-300 mL) of a 1:1 mixture of dichloromethane and 8:2 water–methanol. The water–methanol phase was then extracted at least 4 additional times with an equivalent volume of dichloromethane. The phases were filtered through defatted cotton, and the dichloromethane phase was additionally pass through anhydrous sodium sulfate; all were brought to dryness *in vacuo*. In a subsequent stage, the dichloromethane phase was dissolved in the minimum necessary volume (<40 mL) of 1:1 acetonitrile–methanol and defatted with a similar volume of hexane at least 5 times. These phases were also dried, and their yields were determined.

Secondary fractionation was carried out by FC.  $C_{18}$  modified silica gel with a particle size of  $25 \,\mu$ m Biotage SNAP Ultra (Uppsala, Sweden), packed in cartridges and columns of variable size, was used as a stationary phase. Samples were fractionated in solution or absorbed on variable mixture of Celite 545 and silica gel 60. Elution proceeded with gradients of 0.1% formic acid in water and either methanol or acetonitrile. This was followed by rinses with methanol or an 8:2 mixture of methanol–dichloromethane. The PDA detector acquired at 254, 360, 450, 580, and in scanning mode from 200 to 800 nm. Eluates were automatically collected in volumes  $\leq 50 \, \text{mL}$ , based on changes in the UV absorption maximum. Subsequent analysis of the chromatogram facilitated grouping of the eluates, culminating in the final fractions.

The major constituents of the extracts were isolated by preparative or semipreparative HPLC. Modified silica gel NX-C<sub>18</sub> of 110 Å particle size packed in a Phenomenex Gemini column of 250 mm length and 21.6 mm diameter and Phenomenex Gemini column of 250 mm length and 10 mm diameter were used as stationary phase for preparative and semipreparative chromatography, respectively. Various gradients at a flow rate of 13-15 mL/ min for preparative chromatography and 4.6 mL/min for semipreparative chromatography composed of binary mixtures of 0.1% formic acid in water, methanol, and acetonitrile were used as mobile phase. Samples were dissolved at a minimum volume of 1:1 dioxane-methanol mixture to get a 30-120 mg/mL concentration for preparative chromatography and a maximum volume of 500 µL was injected manually by elution. The PDA detector acquired at 254nm and in scanning mode from 200 to 800nm. A more detailed description of the isolation of each compound can be found in Section S14. Spectrometric (HRMS) and spectroscopic information used for compounds elucidation (RMN spectra) can be consulted in Sections S15-S20.

(*E*)-Tridec-7-ene-3,5,6,10-tetraol (**25**): yellow liquid;  $[\alpha]^{25}_{D} + 11.7$  (*c* 0.6, methanol); <sup>1</sup>H NMR (deuterated chloroform; 700 MHz)  $\delta$  0.94 (3H, t, *J* = 7.42 Hz, H-1), 1.56 (1H, ddd, *J* = 13.66, 7.48, 6.4 Hz, H-2a), 1.71 (1H, ddd, *J* = 13.87, 7.48, 6.56 Hz, H-2b), 4.00 (1H, dq, *J* = 7.85, 6.67 Hz, H-3), 1.63 (1H, ddd, J = 12.69, 7.74, 6.45 Hz, H-4a), 2.35 (1H, dt, J = 12.58, 6.78 Hz, H-4b), 4.11 (1H, td, J = 6.56, 5.27 Hz, H-5), 4.15 (1H, t, J = 6.13 Hz, H-6), 5.55 (1H, ddt, J = 15.27, 6.96, 1.34 Hz, H-7), 5.78 (1H, dddd, J = 15.49, 7.74, 6.82, 1.09 Hz, H-8), 2.28 (1H, m, H-9a), 2.16 (1H, dt, J = 15.38 7.58 Hz, H-9b), 3.67 (1H, m, H-10), 1.45 (2H, overlapped, H-11), 1.36 (1H, q, J = 7.53 Hz, H-12a), 1.45 (1H, overlapped, H-12b), 0.93 (3H, t, J = 7.10 Hz, H-13); <sup>13</sup>C NMR (deuterated chloroform; 175 MHz) δ 10.3 (CH<sub>3</sub>, C-1), 29.7 (CH<sub>2</sub>, C-2), 79.0 (CH, C-3), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C-4), 76.8 (CH, C-5), 85.3 (CH, C-6), 131.9 (CH, C-7), 130.1 (CH, C-8), 40.5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 70.8 (CH, C-10),39.1 (CH<sub>2</sub>, C-11), 19.0 (CH<sub>2</sub>, C-12), 14.2 (CH<sub>3</sub>, C-13); positive ion HRMS-ESI-QTOF *m*/z 229.1812 (calcd for C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub> [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 229.1803, Δ = +3.9 ppm). Spectra available in Section S19.

## 2.8 | Antibacterial Assay

A. baumannii strain A564 and K. pneumoniae strain serotype K2 are Gram-negative bacteria of intrahospital origin resistant to conventional drugs; A564 strain is multiresistant except for colistin, and strain K2 strain is hypervirulent [41, 42]. Bacterial cultures were cryogenically maintained at -80°C in a 4:1 mixture of MH broth and glycerol. Growth inhibition assays were performed based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines for broth microdilution assays [43]. Bacterial cultures were grown in MH broth incubated for 16-24 h with shaking at 37°C. From the liquid culture, 1:20 bacterial dilution in MH broth was prepared from a suspension of 0.5 units of the McFarland scale by adjustment to an optical density at 600nm of 0.08-0.13 (equivalent to  $1.5 \times 10^8$  colony-forming unit or CFU/mL Escherichia coli). All assays were performed on a 96-well flat bottom plate. DMSO was used as a vehicle, and the positive control was gentamicin and colistin. The extracts were evaluated at a final concentration of 250 ppm and isolated compound at 100 ppm. To evaluate the extracts and the positive control,  $2\mu L$  of the sample, 88 µL of MH broth, and 10 µL of diluted bacterial suspension were deposited in each well. To evaluate the growth control, the aliquot of the sample was replaced by vehicle, and in the case of the sterility control, also bacterial suspension was replaced by MH broth. The optical density of the treatments was measured in a microplate reader at 600 nm with continuous shaking for 5-10s at the beginning of the incubation period and after 16-24 h of growth at 37°C. The inhibition percentage was calculated for each well with respect to the average of the growth control using Equation (1):

Percentage of growth inhibition = 
$$\left(1 - \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{negative control}}}\right)(100),$$
(1)

The results are reported as the average of at least three replicates  $\pm$  its standard deviation. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the smallest concentration with 100% growth inhibition by determining the effect of six concentrations of the compound from 0.01 to 200 µg/mL [43]. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by counting CFU of the concentrations that showed 100% inhibition in the bacterial growth test; the inoculum was seeded on MH agar and incubated under the conditions described for the previous experiment, adapted from the guidelines of American Society for Microbiology [44]. MBC is defined as no more than 0.1% of starting CFU's growth in negative control wells.

#### 2.9 | Statistical Analysis

Analysis performed with IBM SPSS Statistics Version 30 (IBM, Armonk, New York, USA). The Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov tests were used to test for normality. Levene's test was used to determine the equality of variances. For statistical significance, a value of p < 0.05 was considered. Plots were generated in GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). The Sankey diagram was generated with SankeyMATIC web (https://sankeymatic.com). Venn diagrams were built with Bioinformatics and Evolutionary Genomics web (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/).

#### 3 | Results and Discussion

This research outlines a strategy to explore the biotechnological potential of ant-associated fungi. Given the exploratory nature of the study, the focus was placed on incorporating fungi from various ant species and their nests, rather than conducting a representative sampling of the studied area. Molecular networking and compound activity mapping were the primary metabolomics techniques employed. These methods were chosen for their effectiveness in unraveling chemical complexity and guiding the isolation of bioactive compounds. In summary, these findings underscore the importance of further bioprospecting the mycobiota associated with ants while emphasizing caution in extrapolating the biological activity and chemical diversity of fungi from other habitats. These points are discussed in detail in the following sections.

# 3.1 | Fungal Diversity of Soil, Ants, and Their Nests

A collection composed of 694 filamentous fungi were isolated from a variety of soil and ant samples collected in the cloud forest of Veracruz, Mexico, and several areas whose original vegetation has been modified: pastures, coffee plantations, ecological parks (suburban area), and agricultural roads (rural area; Figure 1A; Table S1) with several level of disturbance along its borders. This variability is reflected in the location of the anthills collected [45]. Six species of ants were found: Solenopsis geminata (fire ant) and Atta mexicana (leafcutter ant) from the subfamily Myrmicinae; Nomamyrmex esenbeckii and Cheliomyrmex morosus of Ecitoninae, trivially called army ants; Dorymyrmex bicolor from Dolichoderinae; and Camponotus sericeiventris from Formicinae, an arboreal ant. It should be noted that the ant species were not intended to be representative of the surveyed areas; however, more than half of the sampled nests correspond to S. geminata and A. mexicana [46, 47]. Due to the variation in nest structures and the diverse lifestyles of ants, fungal isolates were obtained from different sources: 17 from soil near the nests, 15 from



**FIGURE 1** | Location of the collection points (A). Distribution of bioprospected morphotypes according to ant species and isolation point. Satellite image powered by Esri (https://www.arcgis.com/home/item.html?id=10df2279f9684e4a9f6a7f08febac2a9) Ants' images were taken and modified from AntWeb v8.106.1 (https://www.antweb.org) (B). Comparison of the antibacterial effect of morphotypes, one line connects the effect of the same morphotype (C). Top 10 values against *Acinetobacter baumannii* in a bar chart (positive control of colistin in water at  $20 \mu g/mL$ ). Asterisks mark morphotypes associated with ants (D). Violin plot of *A. baumannii* inhibition according to morphotype origin. The median is drawn with a continuous line and the quartiles with dotted lines. The medians per group do not differ statistically (Kruskal–Wallis test, p = 0.13; E).

soil within mounds, two from tunnels, two from transit areas of army ants (subfamily *Ecitoninae*), and entomogenous fungi from four ant species (Table S2). The isolation method allowed obtaining 666 fungal isolates, 17 in average per sampling site. For entomogenous fungi, a total of 28 morphotypes were isolated from all species, except *S. geminata* and *D. bicolor*. An additional variety of morphotypes did not survive laboratory cultivation (59) or subsequent transfer attempts (35). These morphotypes present technical challenges, as their growth may depend on specific conditions, such as the presence of symbionts [48, 49].

Taxonomic identification of fungi was reserved for those of chemobiological interest. Previous studies have shown that the surveyed area exhibits high richness and diversity of microscopic fungi, with *Penicillium* and *Trichoderma* being the most abundant genera [50–53]. Notably, the mycobiota of disturbed sites undergo modifications. For the areas considered in this research, coffee plantations are the most effective at preserving fungal and ant species richness [54–56]. Complementarily, studies have explored entomogenous and nest-associated fungi from *Atta* species to identify entomopathogenic fungi for biological control and to characterize the symbiotic relationships of fungusgrowing ants [19, 57–59]. Furthermore, studies on the fire ant *Solenopsis invicta* have documented both its entomopathogens and the fungal diversity within its mounds [19, 60–65].

## 3.2 | Screening for Antibacterial Activity

Organic extracts for a random selection of 248 fungi (retaining the proportion of categories from the full collection) were prepared (Table S3). Almost all entomogenous were considered (Figure 1B). The extract yield ranged from 2.9 to 158.3 mg of extract/per gram of substrate; this wide range could be explained in terms of biomass production among morphotypes, for example, to different growth rates or coverage of nutrient requirements by the culture medium [66]. Chemical investigation of the lower yielding fungi was profiled as unlikely (Table S4). Next, the extracts' inhibitory activity against multidrug-resistant pathogens A. baumannii and K. pneumoniae was determined (Table S5). Some fungal extracts were able to inhibit the growth of A. baumannii by more than 50%, but in the case of K. pneumoniae, the maximum inhibition was 34.7% (Figure 1C and Figure S6A). The inhibitory growth effect observed at 250 µg/mL was particularly promising for isolating A. baumannii inhibitors, with notable activity demonstrated by morphotypes IQ-1129 ( $73.4 \pm 3.2\%$ ), and IQ-814 (66.71  $\pm$  3.8%), (Welch's analysis of variance, p < 0.05; post hoc Games-Howell test at 95% confidence level; Figure 1D). The influence of the sampling site in morphotypes bioactivity was statistically evaluated. Nevertheless, no statistical differences were observed (Figure 1E and Figure S6B). Particularly, when the comparison was limited to the best represented ant species (S. geminata and A. Mexicana), no significant differences were observed (Figure S6C). According to the analysis, the bioactive morphotypes are evenly distributed in nearby soil samples, nests, and ants. Conversely, previous studies using

next-generation sequencing and microbial isolation have demonstrated that fungal communities within nests differ significantly from those in the surrounding areas [19, 27, 67]. Notably, the cuticle of *Atta* species yielded few bioactive fungi, perhaps due to the presence of antifungal-producing actinobacteria on the ants' bodies or the association of *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. with their cuticle. This hypothesis requires further research [16, 68–70]. Importantly, it is the first study examining the antibacterial activity of mycobiota in collected ant species.

## 3.3 | Untargeted Metabolomic Analysis

The chemical diversity of the 248 fungal extracts selected was analyzed by molecular networking with the nodes classified according to the morphotypes origin (Figure 2A,B); alternative visualizations can be found in Figure S7. Different analysis parameters to build the networks can lead to different topologies; however, for a first approximation, the networks presented are



**FIGURE 2** | Molecular networks of bioprospected morphotypes. Exclusive nodes according to the isolation point of their morphotype are colored. Networks with three or more nodes and a single color are enclosed with a dotted line (A). Solitary nodes represent 35.8% of the chemical diversity under study (B). The point chart shows m/z ratio of the precursor ions of all nodes in ascending order (C). Venn diagram of 3036 nodes forming the molecular networks, by morphotype origin and in parentheses the number of sampling points (D).

based on the recommendations by GNPS [37]. In a molecular network analysis, the chemical composition is represented as nodes that are connected by edges, and each node is a consensus mass spectrum created from the alignment of those found in HRMS<sup>2</sup> experiments of the extracts and represents a different compound. Solitary nodes correspond to consensus spectra (or cluster), with no fragmentation similarities with the rest, interpreted as coming from unusual chemical structures. Furthermore, networks are groups of interconnected nodes, which correspond to families of consensus spectra, understandable as structural derivatives [71]. Visualizing the chemical diversity of the screened morphotypes reveal the metabolic potential of the bioprospected mycobiota. In this analysis, solitary nodes represent up to one third of the total and the rest are organized in networks; certain networks composed entirely of nodes with a common origin can be identified. More than 90% of the nodes represent small molecules (m/z of precursor ion < 1000 Da; Figure 2C) [72].

Moreover, molecular network analysis allowed for the comparison of chemical diversity across various fungal sources in the collection, revealing that some compounds were exclusively accessible through the isolation of fungi associated with ant nests. The chemical diversity of morphotypes isolated from ants, their nest tunnels, and their transit areas are underrepresented. Chemical diversity between morphotypes of anthills and surroundings was different but was almost equally diverse (Figure 2A,B). Comparing the number of networks whose origin is related to anthills (60) and to their nearby area (57) revealed that the composition is balanced, which also occurs with solitary nodes, 387 and 389, respectively, and even the number of edges per node (Figure S8). In addition, the Venn diagram in Figure 2D reflects the same weight in terms of exclusive nodes. For these reasons, the selective study of fungi associated with anthills may be a valuable criterion for other investigations.

The molecular networks were unified with biological data through compound activity maps using NP Analyst platform (Figure 3) [25]. The analysis allowed to identify precursor ions of putative bioactive molecules. In the network, morphotypes are represented by square nodes and the precursor ions by circular nodes, joined together by edges. Furthermore, predictions are accompanied by two scores encoded in the size and color of the circular nodes; the size increases with the activity score, which measures the intensity of the predicted biological activity. The color of the nodes becomes darker as the clustering score increases; it measures the similarity of biological behavior between extracts.

Compound activity mapping was employed to identify potential candidates against *A. baumannii*. The generated network is composed of square nodes representing the morphotypes and circular nodes representing the presumed bioactive m/z ratios. In this instance, encompasses 90 m/z ratios, ranging from 121 to 1804 Da, distributed among 50 morphotypes (Figure 3). The predicted bioactivity, with a maximum clustering value of 0.73, is relatively low compared to the expected value of up to 3 for the dataset (Figure S21A). However, nodes with clustering values near zero exhibit a higher bioactivity score (~1.73; Figure S21B). This suggests that the most promising bioactive compounds within this mycobiota are not widely distributed but rather more specific to certain fungi. This insight helps predict the potential distribution of bioactivity among the constituents of the selected extracts.

Dereplication analysis of the fungal extract collection identified 15 secondary metabolites from 16 fungi, mostly polyketides, alkaloids, and peptides whose structural core includes meroterpenes, xanthones, anthraquinones, naphthalenes, steroids, polyprenols, azaphilones, dipeptides, and coumarins, to mention



**FIGURE 3** | Compound activity mapping against *Acinetobacter baumannii*. This network has a clustering score > 0.1 (available value: -1 to 1) and an activity score > 0.25 (available value: 0-3). The blue square modes correspond to the morphotypes of interest. Isolated compounds were marked (ion detected  $[2M+H]^+$ ).

10991565, 0, Downloaded from https://analyticalsciencejournals .onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.3513 by Cochrane Mexico, Wiley Online Library on [26/02/2025]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

a few examples. Pyrenocin A (1), secosterigmatocystin (2), versiconol (3), oxalicine B (4), deacetylchloronectrin (5), LL-Z 1272  $\epsilon$  (6), azaphilone 7, oleanane triterpenoid 8, SCH 60059 (9), cyclic polyketide 10, austalide 11, asperversiamide F (12), fonsecin (13), 1',2'-dehydropenicillide (14), and vermixocin A (15) were detected, which makes their corresponding morphotypes candidates to find structural derivatives. However, these isolates were discarded because they are a promising source of known compounds (Figure 4 and Table S9). Interestingly, sometimes related structures are not part of the same network, such as 2 and 3 or 14 and 15; this is due to defects in the network analysis caused by the GNPS algorithm, although to a greater extent it is explained

by the application of strict construction parameters or poor spectrometric acquisitions, in terms of fragmentation; given the structural diversity in a large network, these drawbacks can be solved to a limited extent.

## 3.4 | Chemical Study

Certain bioactive fungi were prioritized according to the level of bioactivity against *A. baumannii*, the complexity of their chemical composition, the potentially bioactive features, and the feasibility of obtaining their extracts. Three of the selected



**FIGURE 4** | Dereplicated compounds and their associated nodes and molecular networks. The color of the nodes retains the code of Figure 2, each one contains the m/z ratio of the precursor ion, and the width of edges encodes the cosine of similarity. Dereplicated nodes are joined to the directly related ones by means of black edges. The image of the morphotypes corresponds to PD agar.

morphotypes came from nest samples and three from soil (Figure 5A and Table S10). To reduce the chemical complexity of the extracts (Table S12) and focus on the isolation of bioactive compounds in a range of polarity, the growth inhibitory activity of the total extracts and their primary fractions towards A. baumannii was determined (Table S13). Variations in the effect of the extracts and their fractions were observed; however, in all cases, the isolation of majority constituents was achieved from primary fractions of medium polarity (Section S14). Surprisingly, IQ-1038 extract lost the expected bioactivity when scaled up, but it was recovered after consecutive fractionations; bioactivity loss by extracts may result, for example, from antagonistic interactions among constituents [73]. This procedure led to the isolation of deoxy-PF1140 (16) and PF1140 (17) from Ascomycete IQ-1129 (Eurotiomycetes, Aspergillaceae); penicillic acid (18) from Ascomycete IQ-1038; brefeldin A (19) from Ascomycete IQ-1017; trichodermic acid (20), trichodermic acid A (21) and C (22) as well as trichodermamide A (23) from Trichoderma sp. IQ-819

(Sordariomycetes, Hypocreaceae); iso-cladospolide B (**24**) from *Clonostachys* sp. IQ-814 (Sordariomycetes, Bionectriaceae); and finally (*E*)-tridec-7-ene-3,5,6,10-tetraol (**25**) from *Cladosporium* sp. IQ-807 (Dothideomycetes, Cladosporiaceae; Figure 5B and Sections S15–S20).

Compound **17** was originally isolated from a *Eupenicillium* species and patented following its broad antifungal effect towards a variety of *Candida* species and other fungi [74]. It was also isolated from a *Penicillium* species, and it was bioactive against ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) but phytotoxic [75, 76]. It was reported to inhibit the development of *Mycoplasma genitalium* and that its mechanism of action involves oxidative stress of an intracellular complex of **17** with iron (Fe<sup>3+</sup>) [77]. Its dehydroxylated derivative **16** was reported from a *Penicillium* of marine origin [78]. Compound **18** is a widely known mycotoxin along with other small lactones. It is an isolated constituent of many fungal species, commonly *Penicillium*, its cytotoxic, and



**FIGURE 5** | Morphotypes under chemical study and their isolation point. The morphotypes were grown on PD agar (A). Isolated compounds and their associated node in molecular networks. The color of the nodes retains the code of Figure 2, each node contains the m/z ratio of the precursor ion, and the edges vary in width according to the cosine similarity. In certain cases, the cosine value is indicated (B).

antimicrobial activity is known, but it is an undesirable metabolite given its toxicity against mammals [79-81]. Lactone 19 was originally isolated from the soil fungus Penicillium decumbens in 1958; it has antifungal, antiviral, phytotoxic, and cytotoxic activity [82, 83]. Compounds 20–22 are commonly isolated from Trichoderma species. The first mention of 20 was made in 2012; since then, a variety of octahydronaphthalenes have been isolated [84-87]. 20 has been reported as a weak cytotoxic agent against several cancer cell lines [86, 87] and has stood out for its significant inhibition of the phytopathogen *Botrytis cinera* [85]. Cyclic dipeptide 23 was described along with other structural derivatives from Penicillium janthinellum. Structurally, trichodermamides have a rare oxazadecalin backbone [88]. Lactone 24 was isolated from the tissue of a marine sponge and a few years later from the fungus *Cladosporium tenuissimum* [89, 90]. Its inhibitory activity against the alveolar adenocarcinoma cell line A564 was described; also, its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity [91-94].

Compound 25 is a linear unsaturated polyol first reported in this work, which was isolated from a fungus Clonostachys, a genus characterized by synthesize polyketides and terpenoids [95]. This compound would give rise to a new chemical group in the genus, as the related polyols are glycitols or polyterpenoids. There are no records on the biological activity of structurally similar compounds [95]. To elucidate compound 25, a molecular formula  $C_{13}H_{26}O_4$ , with a degree of unsaturation, was determined from the relation m/z of adduct ion  $[M + H-H_2O]^+$  in HRMS spectra. Analysis of the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR and HSQC spectra revealed the presence of two methyl groups, five methylenes, and six methines. According to their chemical shifts, two of the methine groups are linked to a sp<sup>2</sup> carbons of a double bond in *trans* position ( $\delta_C / \delta_H 131.9 / 5.5$  and 130.1 / 5.7, J = 15.3 Hz), whereas the rest of resonances belong to four oxymethines ( $\delta_{C}$ 79.0, 76.8, 85.3, and 70.8). Because the molecule has only one spin system, its connectivity was established by analysis of the COSY and HMBC spectra (Figure 6). The relative configuration was established based on NOESY correlations and analysis of the coupling constants. Spectra available in Section S19.

In the molecular networks, the nodes corresponding with the isolated compounds (Figure 5B) support the structural similarity of 16 and 17, but the values of the cosine of similarity (>0.7) with their neighboring nodes reveal two close structural derivatives. Likewise, the nodes of 18, 20, and 24, from which structurally close molecules, can also be expected to be isolated from other fungi. However, the rest of the compounds are mostly part of small networks and, consequently, are exclusive structures of the corresponding fungi. In the case of 25, which does not



appear in the network, it is thought that the analysis conditions made its ionization difficult, and the signal was filtered as noise in the analysis process.

The node closest to 16 with a ratio m/z 280.19 and a cosine of similarity of 0.98 corresponds to the ion  $[M+H]^+$  of a derivative with the molecular formula  $C_{16}H_{26}NO_3$  (3.6 ppm of error), and the signals of both compounds have a different retention times. This derivative is hypothesized to be deoxyakantomycin, whose degradation from 16 was described by De Silva et al. [78]. Furthermore, the ion with a ratio of m/z 264.161 close to 17 is present in many more morphotypes, but it is not an adduct generated in the spectrometric analysis and presents a loss of 14,014 Da, attributable to the loss of a methylene group, and the  $[M+H]^+$  ion of the derivative would have a molecular formula C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> (4.9 ppm error for IQ-1039 fungi). However, the literature search did not find matches for reported molecules classifiable as pyridones. This node and others that make up the network are a possible opportunity for the description of additional chemicals in IQ-1129.

#### 3.5 | Antibacterial Activity of the Compounds

From the evaluation of the isolated compounds, it was determined that **16**, **17**, and **18** inhibit the growth of *A.baumannii* more than 50% at a concentration of  $100 \mu$ g/mL (Table 1). Two bioactive compounds were isolated from IQ-1129 and one from IQ-1038; however, other compounds could contribute to the effect exhibited by the extract; the first fungus was isolated from a *S. geminata* nest and the second from its surroundings. Once the identity of the compounds was established, **18** was excluded from further determinations, as it is a known cytotoxic agent [80].

The MIC of compounds 17 and 16 towards A. baumannii was determined to be  $50 \mu g/mL$  (191.30 and 180.27  $\mu$ M, respectively; Figure 7). Additionally, as the MBC for both compounds was  $> 200 \,\mu g/mL$ , a bacteriostatic effect is inferred at the inhibitory concentrations. At a concentration of  $10\mu g/mL$ , 17 showed a significantly inhibitory effect ( $66.17 \pm 3.72\%$ ) compared to 16. The different susceptibility of the pathogen to the compounds may be related to the capacity of 17 to form hydrogen bonds through its hydroxy group, assuming that the chelating capacity of compound is involved in the mechanism of action, as has been published for M. genitalium; chelation is an important part of the mode of action of several antibacterial agents [77, 96]. This report is the first mention of their antibacterial effect against multidrug-resistant bacteria like A. baumannii strain A564. The bioactivity associated with other structurally related molecules to 16 and 17 highlight the importance of studying tricyclic Nhydroxy-, N-alkoxy, and N-methoxy pyridin-2-ones [97-101]. In this sense, continuing the search for pyridin-2-ones in IQ-1129, exploring the mechanism of action and establishing their toxicity are perspectives that extend to the future.

Compound activity mapping (Figure 7 and Figure S21) predicted the effect of the m/z ratios of 16 and 19–25, but the remaining ones (17 and 18) were false negatives; it is worth mentioning that the range of the predicted effect does not align with the minimum and maximum possible value for the bioactivity score. It has been described that including fractions,

isolated compound.		
Compounds by morphotype	Inhibition percentage	Concentration (mM)
Ascomycete IQ-1129		
Deoxy-PF1140 (16)	$99.92 \pm 0.66$	0.38
PF1140 ( <b>17</b> )	$101.23 \pm 1.71$	0.36
Ascomycete IQ-1038		
Penicillic acid (18)	$67.75 \pm 4.91$	0.59
Ascomycete IQ-1017		
Brefeldin A (19)	$9.89 \pm 3.37$	0.36
Trichoderma sp. IQ-819		
Trichodermic acid ( <b>20</b> )	0	0.33
Trichodermic acid A ( <b>21</b> )	$5.36 \pm 3.93$	0.31
Trichodermic acid C (22)	0	0.31
Trichodermamide A (23)	0	0.23
Cladosporium sp. IQ-807		
iso-Cladospolide B (24)	$6.68 \pm 4.96$	0.44
Clonostachys sp. IQ-814		
( <i>E</i> )-Tridec-7-ene-3,5,6,10- tetraol ( <b>25</b> )	0	0.44
Colistin in water <sup>a</sup>	$99.50 \pm 0.83$	0.02
Gentamicin in water <sup>b</sup>	$29.97 \pm 4.05$	0.11
Negative control	0	
Sterility control	$99.93 \pm 0.11$	

**TABLE 1** | In vitro inhibition of *Acinetobacter baumannii* growth by

*Note:* Experiments carried out at least in quintuplicate, the average, and its standard deviation are presented. Samples were dissolved in dimethylsulfoxide and evaluated at a concentration of  $100 \,\mu$ g/mL unless otherwise indicated. <sup>a</sup>Positive control evaluated at  $20 \,\mu$ g/mL.

<sup>b</sup>Positive control evaluated at 64µg/mL.



**FIGURE 7** | Inhibition of *Acinetobacter baumannii* growth by **16** and **17** at different concentrations. Compounds were dissolved in DMSO. Positive control of colistin in water at  $20 \mu g/mL$  inhibited growth by 99.57±0.50%. Statistically significant differences are indicated (Student's *t*-test, *p* < 0.05).

bioactivity in the analysis improves the result, but that was not necessary [25, 26]. For the purposes of this project, its usefulness was to facilitate the prioritization of bioactive fungi and proved to be a viable strategy when trying to identify the candidates with the highest possible bioactivity; it is important to mention that its application requires careful manual review of the considered nodes.

## Acknowledgments

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica keys IA207422 and IN224424 and Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), through project CF-2019-263977. In this work, we used the NMR equipment from Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear at UNAM funded by CONAHCYT project 0224747. A.S.A.C. acknowledge CONAHCYT for the scholarship 885837 provided to pursue his PhD. The authors thank Dr. Jorge Ernesto Valenzuela González, B.S. Dora Luz Martínez Tlapa, and Dra. Viridiana Vega Badillo (Departamento de Ecología Funcional and Colección Entomológica IEXA, Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México) for taxonomic determination, preparation, and deposition of ant vouchers. Likewise, Dr. Rodolfo García Contreras (Facultad de Medicina, UNAM) for providing bacterial strains. Thanks are due to M.Sc. Everardo Tapia-Mendoza for acquisition of HPLC-QTOF-HRMS2 data (Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural, Instituto de Química, UNAM). We thank Bs.Sc. María de los Ángeles Peña-González, M.Sc. Elizabeth Huerta-Salazar, Dra. Beatriz Quiroz-Garcia, Dra. Adriana Romo-Pérez, Dra. Carmen García-González, and Dr. Francisco Javier Pérez-Flores (Instituto de Química, UNAM) for the acquisition of spectroscopic and spectrometric data. The authors thank Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero (Facultad de Química, UNAM) and Dr. José Antonio Guerrero Analco (Departamento de Química de Productos Naturales, Instituto de Ecología A.C.) for their comments on the research. Open access funding provided by UNAM.

#### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflicts of interest.

#### Data Availability Statement

The data are available free of charge upon request, including molecular networks and compound activity mapping. HPLC-QTOF-HRMS<sub>2</sub> data of metabolomics analysis are available at MassIVE (accession number MSV000094490).

#### References

1. B. B. Larsen, E. C. Miller, M. K. Rhodes, and J. J. Wiens, "Inordinate Fondness Multiplied and Redistributed: The Number of Species on Earth and the New Pie of Life," *Quarterly Review of Biology* 92, no. 3 (2017): 229–265, https://doi.org/10.1086/693564.

2. J. Bérdy, "Bioactive Microbial Metabolites," *Journal of Antibiotics* (*Tokyo*) 58, no. 1 (2005): 1–26, https://doi.org/10.1038/ja.2005.1.

3. D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural Products as Sources of New Drugs Over the Nearly Four Decades From 01/1981 to 09/2019," *Journal of Natural Products* 83, no. 3 (2020): 770–803, https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

4. C. L. Cantrell, F. E. Dayan, and S. O. Duke, "Natural Products as Sources for New Pesticides," *Journal of Natural Products* 75, no. 6 (2012): 1231–1242, https://doi.org/10.1021/np300024u.

5. A. Schueffler and T. Anke, "Fungal Natural Products in Research and Development," *Natural Product Reports* 31, no. 10 (2014): 1425–1448, https://doi.org/10.1039/c4np00060a.

6. M. González-Medina, F. D. Prieto-Martínez, J. J. Naveja, et al., "Chemoinformatic Expedition of the Chemical Space of Fungal Products," *Future Medicinal Chemistry* 8, no. 12 (2016): 1399–1412, https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0079.

7. M. González-Medina, J. R. Owen, T. El-Elimat, et al., "Scaffold Diversity of Fungal Metabolites," *Frontiers in Pharmacology* 8 (2017): 1–12, https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00180.

8. M. I. Hutchings, A. W. Truman, and B. Wilkinson, "Antibiotics: Past, Present and Future," *Current Opinion in Microbiology* 51 (2019): 72–80, https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008.

9. M. F. Traxler and R. Kolter, "Natural Products in Soil Microbe Interactions and Evolution," *Natural Product Reports* 32, no. 7 (2015): 956–970, https://doi.org/10.1039/c5np00013k.

10. D. M. P. De Oliveira, B. M. Forde, T. J. Kidd, et al., "Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens," *Clinical Microbiology Reviews* 33, no. 3 (2020): 1–49, https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19.

11. World Health Organization, WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 (Geneva, Switzerland: WHO, 2024).

12. C. A. Fajardo-Hernández, F. S. T. Khan, L. Flores-Bocanegra, et al., "Insights Into the Chemical Diversity of Selected Fungi From the Tza Itzá Cenote of the Yucatan Peninsula," *ACS Omega* 7, no. 14 (2022): 12171–12185, https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00544.

13. R. Villanueva-Silva, P. Velez, M. Riquelme, et al., "Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi From Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico," *Molecules* 26, no. 23 (2021): 7238, https://doi.org/10.3390/molecules26237328.

14. H. M. Zaffar, V. Strezov, and V. Ajit, *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils: Monitoring, Toxicity, Risk Assessment and Management* (Champ, Switzerland: Springer International Publishing, 2017).

15. D. A. Wardle and B. D. Lindahl, "Disentangling Global Soil Fungal Diversity," *Science (1979)* 346, no. 6213 (2014): 1052–1053, https://doi.org/10.1126/science.aaa1185.

16. D. C. Oh, M. Poulsen, C. R. Currie, and J. Clardy, "Dentigerumycin: A Bacterial Mediator of an Ant-Fungus Symbiosis," *Nature Chemical Biology* 5, no. 6 (2009): 391–393, https://doi.org/10.1038/nchembio.159.

17. S. Haeder, R. Wirth, H. Herz, and D. Spiteller, "Candicidin-Producing Streptomyces Support Leaf-Cutting Ants to Protect Their Fungus Garden Against the Pathogenic Fungus *Escovopsis*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 12 (2009): 4742–4746, https://doi.org/10.1073/pnas.0812082106.

18. W. Dáttilo, M. Vásquez-Bolaños, D. A. Ahuatzin, et al., "Mexico Ants: Incidence and Abundance Along the Nearctic–Neotropical Interface," *Ecology* 101, no. 4 (2020): 16–21, https://doi.org/10.1002/ecy.2944.

19. Á. S. Aguilar-Colorado and J. Rivera-Chávez, "Ants/Nest-Associated Fungi and Their Specialized Metabolites: Taxonomy, Chemistry, and Bioactivity," *Revista Brasileira de Farmacognosia* 33, no. 5 (2023): 901–923, https://doi.org/10.1007/s43450-023-00417-3.

20. L. De-Wei, *Biology of Microfungi* (Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016).

21. J. Rocha, I. Henriques, M. Gomila, and C. M. Manaia, "Common and Distinctive Genomic Features of *Klebsiella pneumoniae* Thriving in the Natural Environment or in Clinical Settings," *Scientific Reports* 12, no. 1 (2022): 10441, https://doi.org/10.1038/s41598-022-14547-6.

22. S. Dekic, J. Hrenovic, G. Durn, and C. Venter, "Survival of Extensively- and Pandrug-Resistant Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Soils," *Applied Soil Ecology* 147 (2020): 103396, https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103396.

23. O.E. Ahuatzin-Flores, E. Torres, and E. Chávez-Bravo, "Acinetobacter baumannii, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review," *Microorganisms* 12, no. 4 (2024): 644, https://doi.org/10.3390/microorganisms12040644.

24. C. Rodrigues, K. Hauser, N. Cahill, et al., "High Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* in European Food Products: A Multicentric Study Comparing Culture and Molecular Detection Methods," *Microbiology Spectrum* 10, no. 1 (2022): 1–13, https://doi.org/10.1128/spectrum.02376-21.

25. S. Lee, J. A. van Santen, N. Farzaneh, et al., "NP Analyst: An Open Online Platform for Compound Activity Mapping," *ACS Central Science* 8, no. 2 (2022): 223–234, https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01108.

26. K. L. Kurita, E. Glassey, and R. G. Linington, "Integration of High-Content Screening and Untargeted Metabolomics for Comprehensive Functional Annotation of Natural Product Libraries," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, no. 39 (2015): 11999–12004, https://doi.org/10.1073/pnas.1507743112.

27. L. B. Duff, T. M. Urichuk, L. N. Hodgins, J. R. Young, and W. A. Untereiner, "Diversity of Fungi From the Mound Nests of *Formica ulkei* and Adjacent Non-nest Soils," *Canadian Journal of Microbiology* 62, no. 7 (2016): 562–571, https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0628.

28. A. Rodrigues, M. R. Z. Passarini, M. Ferro, et al., "Fungal Communities in the Garden Chamber Soils of Leaf-Cutting Ants," *Journal of Basic Microbiology* 54, no. 11 (2014): 1186–1196, https://doi.org/10.1002/jobm.201200458.

29. J. R. King and S. D. Porter, "Recommendations on the Use of Alcohols for Preservation of Ant Specimens (Hymenoptera, Formicidae)," *Insectes Sociaux* 51, no. 2 (2004): 197–202, https://doi.org/10.1007/s0004 0-003-0709-x.

30. S. Van Borm, J. Billen, and J. J. Boomsma, "The Diversity of Microorganisms Associated With *Acromyrmex* Leafcutter Ants," *BMC Evolutionary Biology* 2(2002):1–11, https://doi.org/10.1186/1471-2148-2-9.

31. D. C. Lacap, K. D. Hyde, and E. C. Y. Liew, "An Evaluation of the Fungal "Morphotype" Concept Based on Ribosomal DNA Sequences," *Fungal Diversity* 12 (2003): 53–66.

32. T. Watanabe, *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2010).

33. I. Y. Martínez-Aldino, J. Rivera-Chávez, and J. Morales-Jiménez, "Integrating Taxonomic and Chemical Diversity of Mangrove-Associated ascomycetes to Discover or Repurpose Bioactive Natural Products," *Journal of Natural Products* 86, no. 11 (2023): 2423–2434, https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00490.

34. B. S. Jiménez-Arreola, E. Aguilar-Ramírez, P. Cano-Sánchez, et al., "Dimeric Phenalenones From *Talaromyces* sp. (IQ-313) Inhibit hPTP1B1-400: Insights Into Mechanistic Kinetics From In Vitro and In Silico Studies," *Bioorganic Chemistry* 101, no. May (2020): 103893, https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893.

35. K. Carrillo-Jaimes, C. A. Fajardo-Hernández, F. Hernández-Sedano, et al., "Antibacterial Activity and AbFtsZ Binding Properties of Fungal Metabolites Isolated From Mexican Mangroves," *Revista Brasileira de Farmacognosia* 34, no. 3 (2024): 564–576, https://doi.org/10.1007/s4345 0-023-00507-2.

36. M. Wang, J. J. Carver, V. V. Phelan, et al., "Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data With Global Natural Products Social Molecular Networking," *Nature Biotechnology* 34, no. 8 (2016): 828–837, https://doi.org/10.1038/nbt.3597.

37. A. T. Aron, E. C. Gentry, K. L. McPhail, et al., "Reproducible Molecular Networking of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS," *Nature Protocols* 15, no. 6 (2020): 1954–1991, https://doi.org/10. 1038/s41596-020-0317-5.

38. M. C. Chambers, B. MacLean, R. Burke, et al., "A Cross-Platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics," *Nature Biotechnology* 30, no. 10 (2012): 918–920, https://doi.org/10.1038/nbt.2377.

39. P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, et al., "Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks," *Genome Research* 13, no. 11 (2003): 2498–2504, https://doi.org/10.1101/gr.1239303.

40. H. Horai, M. Arita, S. Kanaya, et al., "MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences," *Journal of Mass Spectrometry* 45, no. 7 (2010): 703–714, https://doi.org/10.1002/jms.1777.

41. M. Y. Cruz-Muñiz, L. E. López-Jacome, M. Hernández-Durán, et al., "Repurposing the Anticancer Drug Mitomycin C for the Treatment of Persistent *Acinetobacter baumannii* Infections," *International Journal of Antimicrobial Agents* 49, no. 1 (2017): 88–92, https://doi.org/10.1016/j. ijantimicag.2016.08.022.

42. J. C. Catalán-Nájera, H. Barrios-Camacho, J. Duran-Bedolla, et al., "Molecular Characterization and Pathogenicity Determination of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Serotype K2 in Mexico," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 94, no. 3 (2019): 316–319, https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.013.

43. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2024).

44. A. L. Leber, *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Washington, USA: American Society for Microbiology Press, 2016).

45. W. Dáttilo, S. A. Cabrera-Cruz, C. A. Gallo-Gómez, J. C. Serio-Silva, and R. Villegas-Patraca, "Current Status of the Remaining Mexican Cloud Forests: Landscape Findings and Conservation Initiatives," *PeerJ* 12, no. 10 (2024): e18386, https://doi.org/10.7717/peerj.18386.

46. M. Á. García-Martínez, D. L. Martínez-Tlapa, G. R. Pérez-Toledo, et al., "Myrmecofauna (Hymenoptera: Formicidae) Response to Habitat Characteristics of Tropical Montane Cloud Forests in Central Veracruz, Mexico," *Florida Entomologist* 99, no. 2 (2016): 248–256, https://doi.org/10.1653/024.099.0214.

47. L. Ríos-Casanova, "Biodiversidad de hormigas en México," *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85, no. SUPPL (2014): 392–398, https://doi.org/10.7550/rmb.32519.

48. B. Turchetti, A. Bevivino, P. Casella, et al., "Selected Case Studies on Fastidious Eukaryotic Microorganisms: Issues and Investigation Strategies," *Diversity (Basel)* 15, no. 7 (2023): 862, https://doi.org/10. 3390/d15070862.

49. R. A. Humber, "Special Considerations for Operating a Culture Collection of Fastidious Fungal Pathogens," *Journal of Industrial Microbiology* 13, no. 3 (1994): 195–196, https://doi.org/10.1007/BF015 84009.

50. R. M. Arias Mota and G. H. Abarca, "Diversity of Soil Culturable fungi in the Tropical Montane Cloud Forest of Veracruz, Mexico," *Scientia Fungorum* 50 (2020): e1290, https://doi.org/10.33885/sf.2020. 50.1290.

51. L. Tedersoo, V. Mikryukov, S. Anslan, et al., "The Global Soil Mycobiome Consortium Dataset for Boosting Fungal Diversity Research," *Fungal Diversity* 111, no. 1 (2021): 573–588, https://doi.org/10.1007/s13225-021-00493-7.

52. M. Samain and C. G. Castillo, *Biodiversidad del Santuario del Bosque de Niebla Xalapa, Veracruz* (Xalapa, Mexico: Instituto de Ecología, A. C, 2020).

53. M. Frąc, S. E. Hannula, M. Bełka, and M. Jędryczka, "Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health," *Frontiers in Microbiology* 9 (2018): 1–9, https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707.

54. R. M. Arias and G. H. Abarca, "Fungal Diversity in Coffee Plantation Systems and in a Tropical Montane Cloud Forest in Veracruz, Mexico," *Agroforestry Systems* 88, no. 5 (2014): 921–933, https://doi.org/10.1007/s10457-014-9736-z.

55. I. Armbrecht and I. Perfecto, "Litter-Twig Dwelling ant Species Richness and Predation Potential Within a Forest Fragment and Neighboring Coffee Plantations of Contrasting Habitat Quality in Mexico," Agriculture, Ecosystems and Environment 97, no. 1–3 (2003): 107–115, https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00128-2.

56. R. H. Manson, V. Hernández Ortiz, S. Gallina, and K. Mehltreter, *Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz biodiversidad, manejo y conservacion* (Veracruz, México: INECOL-SEMARNAT, 2008).

57. M. M. R. Ribeiro, K. D. Amaral, V. E. Seide, et al., "Diversity of Fungi Associated With *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The Activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*," *Psyche* (*London*) 2012 (2012): 1–6, https://doi.org/10.1155/2012/389806.

58. Q. V. Montoya, L. A. Meirelles, P. Chaverri, and A. Rodrigues, "Unraveling Trichoderma Species in the Attine Ant Environment: Description of Three New Taxa," *Antonie van Leeuwenhoek* 109, no. 5 (2016): 633–651, https://doi.org/10.1007/s10482-016-0666-9.

59. G. Carrión, L. Quiroz, and J. Valenzuela, "Hongos entomopatógenos de las hormigas arrieras," *Revista Mexicana de Micología* 12 (1996): 41–48.

60. W. O. H. Hughes, L. Thomsen, J. Eilenberg, and J. J. Boomsma, "Diversity of Entomopathogenic Fungi Near Leaf-Cutting ant Nests in a Neotropical Forest, With Particular Reference to *Metarhizium anisopliae* var. Anisopliae," *Journal of Invertebrate Pathology* 85, no. 1 (2004): 46–53, https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.005.

61. N. Kobmoo, S. Mongkolsamrit, T. Wutikhun, et al., "New Species of *Ophiocordyceps unilateralis*, an Ubiquitous Pathogen of Ants From Thailand," *Fungal Biology* 119, no. 1 (2015): 44–52, https://doi.org/10. 1016/j.funbio.2014.10.008.

62. S. Woolfolk, C. E. Stokes, C. Watson, G. Baker, R. Brown, and R. Baird, "Fungi Associated With *Solenopsis invicta Buren* (Red Imported Fire Ant, Hymenoptera: Formicidae) From Mounds in Mississippi," *Southeastern Naturalist* 15, no. 2 (2016): 220–234, https://doi.org/10. 1656/058.015.0203.

63. B. S. Bamisile, J. A. Siddiqui, L. Nie, et al., "Baseline Analysis of Endophytic Fungal Associates of *Solenopsis invicta* Buren From Mounds Across Five Counties of Guangdong Province, China," *Journal of Fungi* 9, no. 3 (2023): 377, https://doi.org/10.3390/jof9030377.

64. Y. Y. Sokolova and J. R. Fuxa, "Biology and Life-Cycle of the Microsporidium *Kneallhazia solenopsae* Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., From the Fire Ant *Solenopsis Invicta*," *Parasitology* 135, no. 8 (2008): 903–929, https://doi.org/10.1017/S003118200 800440X.

65. C. Espinoza, I. Zavala-Izquierdo, A. Couttolenc, G. Landa-Cadena, J. Valenzuela, and Á. Trigos, "In Vitro Isolation and Identification of *Leucoagaricus gongylophorus* From *Atta Mexicana (Hymenoptera: Formicidae)* Fungal Garden," *Revista Mexicana de Micología* 46 (2017): 3–8.

66. K. M. VanderMolen, H. A. Raja, T. El-Elimat, and N. H. Oberlies, "Evaluation of Culture Media for the Production of Secondary Metabolites in a Natural Products Screening Program," *AMB Express* 3, no. 1 (2013): 71, https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-71.

67. S. Lindström, S. Timonen, L. Sundström, and H. Johansson, "Ants Reign Over a Distinct Microbiome in Forest Soil," *Soil Biology and Biochemistry* 139, no. June (2019): 107529, https://doi.org/10.1016/j.soilb io.2019.107529.

68. S. M. Valencia-Giraldo, A. Gutiérrez-Urrego, A. Niño-Castro, A. López-Peña, and J. Montoya-Lerma, "Bacterial Microbiota Associated With the Leaf-Cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae): Dynamics During Development and Potential Role in Defence," *Physiological Entomology* 49, no. 1 (2024): 23–38, https://doi.org/10. 1111/phen.12423.

69. A. V. Santos, R. J. Dillon, V. M. Dillon, S. E. Reynolds, and R. I. Samuels, "Ocurrence of the Antibiotic Producing Bacterium Burkholderia sp. in Colonies of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Rubropilosa," *FEMS Microbiology Letters* 239, no. 2 (2004): 319–323, https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.005.

70. M. O. Nascimento, A. C. Teles Tenório, R. A. Sarmento, et al., "Soil Actinobacteria Inhibit Antagonistic Fungi of Leafcutter Ant Colonies," *Journal of Basic Microbiology* 62, no. 1 (2022): 63–73, https://doi.org/10. 1002/jobm.202100476.

71. L.-F. Nothias, D. Petras, R. Schmid, et al., "Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment," *Nature Methods* 17, no. 9 (2020): 905–908, https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6.

72. M. Bergkessel, B. Forte, and I. H. Gilbert, "Small-Molecule Antibiotic Drug Development: Need and Challenges," *ACS Infectious Diseases* 9, no. 11 (2023): 2062–2071, https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00189.

73. L. K. Caesar and N. B. Cech, "Synergy and Antagonism in Natural Product Extracts: When 1 + 1 Does Not Equal 2," *Natural Product Reports* 36, no. 6 (2019): 869–888, https://doi.org/10.1039/C9NP00011A.

74. R. Hosoya, T. Yugami, S. Yoshida, et al., "Fungicide PF1140 Manufacture With Eupenicillium," Japan Patent No. 07267962, (1996).

75. Y. Yokoyama, T. Koseki, D. Harneti, R. Maharani, U. Supratman, and Y. Shiono, "Phytotoxic Compounds Isolated From a Sea Snail Derived Fungus, *Penicillium vancouverense* YY-1," *Phytochemistry Letters* 39 (2020): 57–63, https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.008.

76. Ö. Demir, B. Schulz, L. Rabsch, M. Steinert, and F. Surup, "Strong Antagonism of an Endophyte of *Fraxinus excelsior* Towards the Ash Dieback Pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, Is Mediated by the Antifungal Secondary Metabolite PF1140," *Applied and Environmental Microbiology* 90, no. 6 (2024): 1–13, https://doi.org/10.1128/aem. 00665-24.

77. T. Peramuna, C. M. Kim, L. K. T. Aguila, K. L. Wendt, G. E. Wood, and R. H. Cichewicz, "Iron (III) Binding Properties of PF1140, a Fungal N-Hydroxypyridone, and Activity Against *Mycoplasma genitalium*," *Journal of Natural Products* 87, no. 7 (2024): 1746–1753, https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c00209.

78. E. D. De Silva, A.-S. Geiermann, M. I. Mitova, et al., "Isolation of 2-Pyridone Alkaloids From a New Zealand Marine-Derived *Penicillium* Species," *Journal of Natural Products* 72, no. 3 (2009): 477–479, https://doi.org/10.1021/np800627f.

79. J. C. Frisvad, "A Critical Review of Producers of Small Lactone Mycotoxins: Patulin, Penicillic Acid and Moniliformin," *World Mycotoxin Journal* 11, no. 1 (2018): 73–100, https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294.

80. D. Zhang, W. Sun, W. Xu, et al., "Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Endophytic Fungi From *Lagopsis supina*," *Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, no. 4 (2023): 543–551, https://doi.org/10.4014/jmb.2211.11055.

81. P. K. Chan, C. S. Reddy, and A. W. Hayes, "Acute Toxicity of Penicillic Acid and Its Interaction With Pentobarbital and Other Compounds," *Toxicology and Applied Pharmacology* 52, no. 1 (1980): 1–9, https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90240-9.

82. R. Glaser, D. Shiftan, and M. Froimowitz, "NMR Structure Determination of Brefeldin-A, a 13-Membered Ring Fungal Metabolite," *Magnetic Resonance in Chemistry* 38, no. 4 (2000): 274–280, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(200004)38:4<274::AID-MRC630>3.0. CO;2-M.

83. J. Xie, Y. Y. Wu, T. Y. Zhang, et al., "New and Bioactive Natural Products From an Endophyte of: *Panax notoginseng*," *RSC Advances* 7, no. 60 (2017): 38100–38109, https://doi.org/10.1039/c7ra07060h.

84. D. Li, Y. Chen, M. Tao, H. H. Li, and W. M. Zhang, "Two New Octahydronaphthalene Derivatives From *Trichoderma spirale*, an Endophytic Fungus Derived From *Aquilaria sinensis*," *Helvetica Chimica Acta* 95, no. 5 (2012): 805–809, https://doi.org/10.1002/hlca. 201100417.

85. J.-L. Wu, Y.-H. Yu, H.-Z. Yao, X. Zhao, T. Yuan, and Y. H. Huang, "Trichodermic Acids From an Endophytic *Trichoderma* sp. and Their Antifungal Activity Against the Phytopathogen *Botrytis cinerea*," *Phytochemistry Letters* 56 (2023): 24–29, https://doi.org/10.1016/j.phy-tol.2023.06.004.

86. T. Zhao, L.-L. Xu, Y. Zhang, et al., "Three New  $\alpha$ -Pyrone Derivatives From the Plant Endophytic Fungus *Penicillium ochrochloronthe* and Their Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities," *Journal of Asian Natural Products Research* 21, no. 9 (2019): 851–858, https://doi. org/10.1080/10286020.2018.1495197.

87. F. F. Sofian, F. A. Warahapsari, J. Yoshida, Y. Ito, T. Koseki, and Y. Shiono, "Two New Octahydronaphthalene Derivatives, Trichodermic Acids C and D Produced by *Trichoderma* sp. HN-1.1," *Natural Product Research* 37, no. 3 (2023): 484–493, https://doi.org/10.1080/14786419. 2021.1983811.

88. M.Zhu,Z.Yang,H.Feng, et al., "Trichodermamides D–F, Heterocyclic Dipeptides With a Highly Functionalized 1,2-Oxazadecaline Core Isolated From the Endophytic Fungus *Penicillium janthinellum* HDN13-309," *RSC Advances* 7, no. 76 (2017): 48019–48024, https://doi.org/10.1039/C7RA10389A.

89. C. J. Smith, D. Abbanat, V. S. Bernan, et al., "Novel Polyketide Metabolites From a Species of Marine Fungi," *Journal of Natural Products* 63, no. 1 (2000): 142–145, https://doi.org/10.1021/np990361w.

90. H. Dai, Q. Kang, G. Li, and Y. Shen, "Three new Polyketide Metabolites From the Endophytic Fungal Strain *Cladosporium tenuissimum* LR463 of *Maytenus hookeri*," *Helvetica Chimica Acta* 89, no. 3 (2006): 527–531, https://doi.org/10.1002/hlca.200690055.

91. K. R. Prasad and V. R. Gandi, "Enantioselective Total Synthesis of Iso-Cladospolide B, Cladospolide C and Cladospolide B From Tartaric Acid," *Tetrahedron: Asymmetry* 22, no. 5 (2011): 499–505, https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2011.02.018.

92. G. V. M. Sharma, K. Laxmi Reddy, and R. J. Janardhan, "First Synthesis and Determination of the Absolute Stereochemistry of Iso-Cladospolide-B and Cladospolides-B and C," *Tetrahedron Letters* 47, no. 37 (2006): 6537–6540, https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.07.044.

93. X. Cao, L. Guo, C. Cai, et al., "Metabolites From the Mangrove-Derived Fungus *Cladosporium* sp. HNWSW-1," *Frontiers in Chemistry* 9 (2021): 1–8, https://doi.org/10.3389/fchem.2021.773703.

94. C. R. Reddy, D. Suman, and N. N. Rao, "Alkyne-Mediated Approach for Total Syntheses of Cladospolides A, B, C and Iso-Cladospolide B," *European Journal of Organic Chemistry* 2013, no. 18 (2013): 3786–3796, https://doi.org/10.1002/ejoc.201300022.

95. P. Han, X. Zhang, D. Xu, B. Zhang, D. Lai, and L. Zhou, "Metabolites From *Clonostachys* Fungi and Their Biological Activities," *Journal of Fungi* 6, no. 4 (2020): 229, https://doi.org/10.3390/jof6040229.

96. D. Repac Antić, M. Parčina, I. Gobin, and D. M. Petković, "Chelation in Antibacterial Drugs: From Nitroxoline to Cefiderocol and Beyond," *Antibiotics* 11, no. 8 (2022): 1105, https://doi.org/10.3390/antibiotic s11081105.

97. M. Isaka, M. Tanticharoen, P. Kongsaeree, and Y. Thebtaranonth, "Structures of Cordypyridones A–D, Antimalarial N -Hydroxy- and N-Methoxy-2-Pyridones From the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps nipponica*," *Journal of Organic Chemistry* 66, no. 14 (2001): 4803–4808, https://doi.org/10.1021/jo0100906.

98. Y.-X. Zhu, C. Peng, W. Ding, J. F. Hu, and J. Li, "Chromenopyridin A, a new N -Methoxy-1-Pyridone Alkaloid From the Endophytic Fungus *Penicillium nothofagi* P-6 Isolated From the Critically Endangered Conifer *Abies beshanzuensis*," *Natural Product Research* 36, no. 8 (2022): 2049–2055, https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1844700.

99. Y. Hui, T. Tang, J. Wang, et al., "Fusaricide Is a Novel Iron Chelator That Induces Apoptosis Through Activating Caspase-3," *Journal of Natural Products* 84, no. 8 (2021): 2094–2103, https://doi.org/10.1021/ acs.jnatprod.0c01322.

100. C. Zhang, L. Jin, B. Mondie, et al., "Leporin B: A Novel Hexokinase II Gene Inducing Agent From an Unidentified Fungus," *Bioorganic &* 

Medicinal Chemistry Letters 13, no. 8 (2003): 1433–1435, https://doi.org/ 10.1016/S0960-894X(03)00153-7.

101. M. R. TePaske, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, and P. F. Dowd, "Leporin A: An Antiinsectan N-Alkoxypyridone From the Sclerotia of *Aspergillus leporis*," *Tetrahedron Letters* 32, no. 41 (1991): 5687–5690, https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)93530-5.

## **Supporting Information**

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.