

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**EFFECTO DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGÓNICOS
COMO POTENCIALES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGA
ARRIERA *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: MYRMICINAE)**

SANDRA MILENA VALENCIA GIRALDO

DIRECTORES:

JAMES MONTOYA LERMA, PhD.

CAROLINA GIRALDO ECHEVERRI, MSc.

**MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MARZO DE 2014**

**EFFECTO DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGÓNICOS
COMO POTENCIALES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGA
ARRIERA *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: MYRMICINAE)**

SANDRA MILENA VALENCIA GIRALDO

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de
Magister en Ciencias-Biología

Director

JAMES MONTOYA LERMA

Biólogo, PhD.

Codirectora

CAROLINA GIRALDO ECHEVERRI

Bióloga, MSc.

MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

MARZO DE 2014



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

Jurado conformado por:

JUDITH BETANCUR U., Universidad de Antioquia
NEYLA BENÍTEZ C., Universidad del Valle

El día 20 de Mayo de 2014 a las 9:00 a.m. se llevó a cabo la sustentación del Trabajo de Investigación: **"Efecto de microorganismos entomopatógenos y antagonicos como potenciales agentes de control biológico de hormiga arriera Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmicinae)"**, presentada por la estudiante **Sandra Milena Valencia Giraldo**, código 1102649, Plan 7180, candidata a grado para la próxima ceremonia.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

☒ APROBADA () MERITORIA () LAUREADA

Regístrese esta calificación.

- () REPROBADA: El estudiante debe matricularse en esta actividad.
() PENDIENTE: El estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el Director de Tesis.
() Requiere () No requiere nueva sustentación.
El plazo para nueva sustentación y/o presentación del documento es de: _____

OBSERVACIONES

El trabajo de investigación es muy bueno Meritorio
por la rigurosidad, el diseño, los resultados y las
metodologías utilizadas muy apropiadas.

Santiago de Cali, 20 de Mayo de 2014


JUDITH BETANCUR U.
Jurado


NEYLA BENÍTEZ C.
Jurado


JAMES MONTOYA L.
Director de Tesis


ALBA MARINA TORRES G.
Directora Postgrado en Ciencias-Biología
Coordinadora de la Sustentación

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue desarrollada con el apoyo de la Fundación Centro para la investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria –CIPAV – en el marco del proyecto “Alteración de las relaciones simbióticas como estrategia de control biológico de hormiga arriera *Atta cephalotes*”, financiado por Colciencias. Igualmente contó con apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle a través del proyecto “Formulación de un conjugado microbiano para el control biológico de colonias naturales de hormiga arriera, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae)”, aprobado en la convocatoria interna de 2013.

Le agradezco de manera especial a mi director James Montoya Lerma y mi codirectora Carolina Giraldo por todo su apoyo, su guía, colaboración y valiosas sugerencias durante el desarrollo de esta investigación y la escritura del documento final. Gracias por abrirme las puertas y enriquecer mi formación con esas búsquedas que van más allá de la academia.

A mis ex-profesores de la Universidad de Antioquia, en especial a Judith Betancur Urhán y Jhon Jairo Ramírez por todas sus valiosas enseñanzas que contribuyeron de manera integral con mi crecimiento personal y profesional.

A los profesores del posgrado en Ciencias – Biología de la Universidad del Valle, especialmente a Inge Armbrrecht, Alba Marina Torres y Jaime Cantera, por su buena disposición y sus valiosos aportes a mi formación en la Maestría.

Al grupo GEAHNA, y al grupo de investigación en hormiga arriera por todo su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de la maestría y todo el personal de la sección de Entomología. De manera muy especial a Karen Castaño, Diana Ortiz, Carolina Giraldo y Jonathan Rodríguez por su gran colaboración en las largas jornadas de trabajo en el laboratorio. Gracias por acogerme con tanta calidez y por los buenos momentos, esos que hacen de lo cotidiano algo especial. Siempre me han hecho sentir como en casa.

Agradezco a mi familia por su apoyo permanente e incondicional en las decisiones y caminos que he elegido. A Oswaldo Díaz por estar siempre, sin condiciones.

CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1 DISTRIBUCIÓN DE LA HORMIGA ARRIERA.....	20
2.2 GENERALIDADES DEL POLIMORFISMO EN <i>Atta cephalotes</i>	21
2.3 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A HORMIGA ARRIERA Y ESTRATEGIAS DE DEFENSA.....	22
2.4 CONTROL DE LA HORMIGA ARRIERA.....	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	30
4.2 COLECTA DE NÚCLEOS DE HORMIGA ARRIERA, <i>A. cephalotes</i>	31
4.3 OBTENCIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS.....	32
4.4 AISLAMIENTO DEL HONGO SIMBIONTE.....	33
4.5 PRUEBAS DE ANTAGONISMO SOBRE EL HONGO SIMBIONTE.....	34
4.6 PRUEBAS DE ANTAGONISMO SOBRE <i>Serratia marcescens</i>	35

4.7	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD SOBRE OBRERAS DE <i>A. cephalotes</i>	36
4.8	PRUEBAS DE COEXISTENCIA ENTRE MICROORGANISMOS CON EFECTO ANTAGÓNICO Y/O INSECTICIDA	38
4.9	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	40
5.	RESULTADOS	41
5.1	ABUNDANCIA DE HONGOS Y BACTERIAS HETERÓTROFAS EN DESECHOS DE COLONIAS DE <i>A. cephalotes</i>	41
5.2	ANTAGONISMO SOBRE EL HONGO <i>L. gongylophorus</i>	44
5.3	ANTAGONISMO SOBRE LA BACTERIA <i>S. marcescens</i>	50
5.4	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD SOBRE OBRERAS DE <i>A. cephalotes</i>	51
5.4.1	Evaluación del potencial insecticida de los aislados de hongos	51
5.4.2	Evaluación del potencial insecticida de los aislados de bacterias	62
5.5	PRUEBAS DE COEXISTENCIA ENTRE LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL ANTAGÓNICO Y/O INSECTICIDA	71
5.5.1	Coexistencia entre hongos	71
5.5.2	Coexistencia entre hongos y bacterias	77
5.5.3	Coexistencia entre bacterias	81
6.	DISCUSIÓN	85
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	102
8.	LITERATURA CITADA	103

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Valores promedio de abundancia (UFC/g) de hongos y bacterias heterótrofas totales en los desechos de las colonias de *A. cephalotes* para los dos tiempos de evaluación. 42

Tabla 2. Valores promedio de abundancia (UFC/g) y frecuencia de los aislados de hongos y bacterias seleccionadas para los ensayos de capacidad antagónica y entomopatógena. 42

Tabla 3. Valores promedio de las variables evaluadas para los aislamientos nativos de hongos en los tratamientos por ingestión y contacto. 62

Tabla 4. Valores promedio de las variables evaluadas para los aislamientos nativos de hongos en los tratamientos por ingestión y contacto. 71

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Eficiencia de crecimiento promedio del hongo mutualista en los diferentes tratamientos de enfrentamiento con los aislados de hongos.	45
Figura 2. Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento del hongo simbiote en los tratamientos de enfrentamiento con los aislados de hongos.	46
Figura 3. Eficiencia de crecimiento promedio del hongo mutualista en los diferentes tratamientos de enfrentamiento con los aislados de bacterias.....	48
Figura 4. Microfotografía de gongilidios inalterados de <i>L. gongylophorus</i>	48
Figura 5. Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento del hongo simbiote en los tratamientos de enfrentamiento con los aislados de bacterias.....	49
Figura 6. Medida promedio del diámetro del disco en los enfrentamientos entre los hongos y <i>S. marcescens</i>	50
Figura 7. Medida promedio del diámetro del disco en los enfrentamientos entre las bacterias y <i>S. marcescens</i>	51
Figura 8. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de hongos (primera repetición en el tiempo).	52
Figura 9. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de hongos (primera repetición en el tiempo).	54
Figura 10. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos en el día tres, día seis y día 10 del experimento (primera repetición en el tiempo).	56
Figura 11. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de hongos (segunda repetición en el tiempo).....	57
Figura 12. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de hongos (segunda repetición en el tiempo).....	58
Figura 13. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos en el día tres, día seis y día 10 del experimento (segunda repetición en el tiempo).	60

Figura 14. Promedio del tiempo letal medio TL_{50} en los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos.	61
Figura 15. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de bacterias (primera repetición en el tiempo).	63
Figura 16. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de bacterias (primera repetición en el tiempo).	64
Figura 17. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias en el día tres, día seis y día 10 del experimento (primera repetición en el tiempo).	66
Figura 18. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de bacterias (segunda repetición en el tiempo).	67
Figura 19. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de bacterias (segunda repetición en el tiempo).	68
Figura 20. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias en el día tres, día seis y día 10 del experimento (segunda repetición en el tiempo).	69
Figura 21. Promedio del tiempo letal medio TL_{50} en los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias.	70
Figura 22. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Fusarium</i> sp.1 en los enfrentamientos con cada uno de los hongos.	73
Figura 23. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Fusarium</i> sp.2 en los enfrentamientos con cada uno de los hongos.	74
Figura 24. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>A. ochraceus</i> en los enfrentamientos con cada uno de los hongos.	75
Figura 25. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>A. flavus</i> en los enfrentamientos con cada uno de los hongos.	76
Figura 26. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Penicillium</i> sp. en los enfrentamientos con cada uno de los hongos.	76
Figura 27. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Fusarium</i> sp.1 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	78

Figura 28. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Fusarium</i> sp.2 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	79
Figura 29. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>A. flavus</i> en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	79
Figura 30. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>A. ochraceus</i> en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	80
Figura 31. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Penicillium</i> sp. en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	80
Figura 32. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Enterobacter</i> sp. en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	81
Figura 33. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>S. liquefasciens</i> en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	82
Figura 34. Eficiencia de crecimiento promedio del aislado DHB-338 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	83
Figura 35. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Bacillus subtilis</i> en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	84
Figura 36. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Bacillus</i> sp.1 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	84
Figura 37. Eficiencia de crecimiento promedio de <i>Bacillus</i> sp.2 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias.	85

RESUMEN

Atta cephalotes (L.) (Hymenoptera: Myrmicinae) es la más abundante de las hormigas cortadoras de hojas en Colombia. Sus altas poblaciones, consecuencia del incremento de áreas fragmentadas, ocasionan pérdidas en cultivos de importancia agrícola y forestal. El control con insecticidas químicos, es poco efectivo y sus efectos ambientales muy controvertidos. Como alternativa, se busca promover el control natural. En esta dirección, se evaluó la capacidad antagónica de nueve aislados nativos de hongos y nueve de bacterias sobre *L. gongylophorus* y *Serratia marcescens*, simbiontes de esta especie de hormiga. Además, se evaluó la actividad insecticida de los mismos aislados, mediante contacto e ingestión. Aquellos microorganismos que demostraron tener actividad antagónica y/o entomopatógena, fueron enfrentados para establecer el grado de coexistencia. Todos los aislamientos se realizaron a partir de los desechos de nidos de hormigas criadas en laboratorio. Los aislados compatibles con *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium* sp. dos morfoespecies de *Fusarium*, al igual que dos del género *Bacillus*, afectaron negativamente al hongo simbionte. *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. fueron los más efectivos con una inhibición del 65,18% y 51,94%, respectivamente. El hongo *A. flavus* fue el único con un efecto sobre *S. marcescens*, al afectar su crecimiento y la producción de pigmento. De otro lado, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia liquefaciens*, *Bacillus subtilis*, dos morfoespecies más de *Bacillus* y *S. marcescens*, tuvieron una actividad insecticida importante, siendo en general, mayor el efecto en las aplicaciones por contacto. *A. flavus*, *A. ochraceus* y *Penicillium* sp. mostraron mejor actividad que los entomopatógenos de uso comercial, *Beauveria bassiana*

y *Metarhizium anisopliae*, en términos de la mortalidad acumulada, TL_{50} y porcentaje de colonización. Por otra parte, la capacidad de coexistencia fue variable, demostrando que *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. y *A. flavus* tienen baja capacidad de crecer en mezcla con los demás microorganismos, por lo que las condiciones más apropiadas para su formulación deben ser evaluadas. Los resultados indican que estos aislados nativos de hongos y bacterias son promisorios para la elaboración de productos biológicos para el control de la hormiga y se constituyen en línea base para investigaciones futuras.

Palabras claves: Aislados microbianos nativos, asociación simbiótica, *Leucoagaricus gongylophorus*, *Serratia marcescens*.

ABSTRACT

Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmicinae) is the most abundant leaf-cutting ant in Colombia. Its high populations, a consequence of the increasing of fragmented areas, causes considerable economic losses in different crops. Its control is mainly through the use of synthetic chemicals; however, this kind of control is not sufficiently effective and is very harmful to the human and environmental health. In the search of biological and unharmed alternatives to control this pest, the antagonistic activity of nine fungi and nine bacteria against *Leucoagaricus gongylophorus* and *Serratia marcescens*, the proven ant symbiotic microorganisms, were evaluated. In addition, the insecticide effect of these 18 microorganisms, either oral or topical application, was investigated. Finally, it was analyzed their capacity to grow together. Fungi and bacteria isolated from waste material of colonies kept under laboratory conditions were grown using standard procedures. *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium* sp. two morphospecies of *Fusarium*, as well as two morphospecies of *Bacillus*, were inhibiting the growth of the symbiotic fungus. *Mucor* sp. and *Trichoderma* sp. were the strongest inhibitors achieving a percentage of 65.18% y 51.94%, respectively. Only the fungus *A. flavus*, had an effect on *S. marcescens*, affecting its growth and the production of pigment. On the other hand, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Enterobacter* sp. *Serratia liquefaciens*, *Bacillus subtilis*, other two morphospecies of *Bacillus* and *S. marcescens*, had insecticidal activity, being better, in general when directly applied to the ants. *A. flavus*, *A. ochraceus* and *Penicillium* sp. had a better activity than the commercial entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. The capacity of bacteria and fungi to

grow together was variable. *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. and *A. flavus* had low capacity, being necessary to evaluate the appropriate conditions to produce a formulated product. These results indicate that the indigenous isolates of fungi and bacteria are promising in the search of control strategies for the leaf-cutting ant, *A. cephalotes*.

Keywords: microbial isolated indigenous, symbiotic association, *Leucoagaricus gongylophorus*, *Serratia marcescens*.

1. INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, son los herbívoros generalistas más dominantes del neotrópico, de donde son exclusivas (Hölldobler & Wilson, 2011), llegando a ser consideradas como una de las principales plagas de cultivos agrícolas y forestales en América Latina (Fernández & Jaffé, 1995; López & Orduz, 2004; Montoya-Lerma *et al.*, 2012). De las cuatro especies de *Atta* presentes en Colombia, *A. cephalotes* (L.), conocida como hormiga arriera, es la más abundante (Montoya-Lerma *et al.*, 2012). Su proliferación descontrolada es en parte, una consecuencia del inadecuado control y del deterioro ambiental en zonas comprendidas entre 0 y 1.800 metros de altura. Su mayor impacto se debe al daño económico, aún no cuantificado, relacionado con la defoliación parcial o total de cultivos (Forti *et al.*, 2000), siendo el café, cacao, cítricos, maíz, yuca y algodón, los más frecuentemente atacados. No obstante, los pastos nativos e introducidos y las especies de uso forestal, tanto en plantaciones, como en silvopastoriles, también son frecuentemente afectados (Cherrett, 1986; Moulaert *et al.*, 2002; Montoya-Lerma *et al.*, 2012). Además, estas hormigas son percibidas como plagas de importancia urbana, al causar inestabilidad en terrenos y subsidencia en viviendas y construcciones (Montoya-Lerma *et al.*, 2006).

Existen varios métodos para el control de las hormigas cortadoras de hojas, entre ellos el control mecánico, cultural, biológico y químico; sin embargo, la compleja organización social de éstas, sus respuestas eficientes a las perturbaciones, la estructura interna de sus

nidos y la estrecha relación simbiótica con microorganismos, dificulta la aplicación de dichos métodos. Históricamente, los productos químicos como organofosforados, piretroides y sulfuramidas (Godoy *et al.*, 2005; Della Lucia, 2011), han gozado de una buena aceptación, pese a que son poco eficientes a mediano y largo plazo y a sus efectos nocivos sobre el ambiente y toxicidad para especies no blanco (Della Lucia, 2003, Godoy *et al.*, 2005). Además, la aplicación de estos productos a través del tiempo, genera graves problemas, no sólo en relación con el deterioro del suelo y del ecosistema, sino que también afecta la economía del agricultor al incrementar los costos de producción y tiene serios efectos sobre la salud humana (Sinha *et al.*, 2006; Montoya-Lerma *et al.*, 2012).

El clorpirifos (*e.g.* Lorsban®) es un insecticida de aplicación foliar y en suelos, que tiene la capacidad de acumularse en los tejidos vivos, lo que implica un riesgo para diferentes organismos y para la salud humana (Serrano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005). En varias regiones del mundo, es uno de los más frecuentemente detectados en cuerpos de agua superficiales y subterránea, constituyéndose en una amenaza para las especies acuáticas (Domagalski & Munday, 2003).

Debido a que el clorpirifos no es fácilmente soluble en agua, puede permanecer como persistente en suelos y sedimentos de cuerpos de agua. En el agua su promedio de vida media es de días a semanas (US EPA, 2002), dependiendo de la variación en factores como el pH, temperatura, contenido de materia orgánica y la formulación del pesticida (Racke *et al.*, 1988). A pesar de su baja persistencia ambiental en el agua y su vida media relativamente baja, son más tóxicos que otros pesticidas (como los organoclorados),

afectando de forma crónica las especies animales con ciclos de vida cortos (Giraldo & Palacios, 1999) y generando bioacumulación en plantas acuáticas (Asselborn *et al.*, 2000). Se ha demostrado los efectos adversos del clorpirifos sobre las tasas de supervivencia y las tasas de crecimiento de anfibios, generando malformaciones y problemas de comportamiento (Bonfanti *et al.*, 2004; Gallo-Delgado *et al.*, 2006).

Este organofosforado es el plaguicida más utilizado en Colombia con un volumen de producción de 776.824,76 Kg (Arboleda *et al.*, 2000). En Cali, en el 2010, los propietarios de casas en algunos conjuntos residenciales suburbanos, utilizaron un promedio de 2kg/mes/casa de clorpirifos, es decir, aproximadamente, 4,8 toneladas/año de este insecticida para el control de las hormigas arrieras en una sólo urbanización (Montoya-Lerma *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad aplicada de este pesticida el problema continúa sin solución.

Este organofosforado representa un riesgo para la salud humana, principalmente por sus propiedades tóxicas y sus efectos negativos en el sistema nervioso, generando anormalidades morfológicas y funcionales a nivel de desarrollo neuronal, debido a que genera una disrupción de la maquinaria celular que controla la replicación y la diferenciación celular, la apoptosis y la formación del circuito neuronal (Rauh *et al.*, 2012).

Rauh *et al.* (2012) demostraron que la exposición prenatal al clorpirifos causa alteraciones morfológicas y fisiológicas en el cerebro de bebés en formación, cuyos efectos son irreversibles, además de causar daños en los sistemas respiratorio, nervioso y

cardiovascular en adultos (Sinha *et al.*, 2006). Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud ha prohibido su uso, y muchos países han aceptado dicha disposición (Della Lucia, 2011; Rauh *et al.*, 2012).

Con el fin de sustituir los agroquímicos convencionales, se ha intensificado la búsqueda de métodos alternativos de control que sean eficaces y menos agresivos con el ambiente (Santos-Oliveira *et al.*, 2006; De Melo Cazal *et al.*, 2009). Durante los últimos 50 años, se ha avanzado en el desarrollo de nuevas estrategias dirigidas al manejo integrado de insectos plaga, entre las que se destaca el control biológico con agentes microbianos, en especial con hongos entomopatógenos, como una alternativa al control químico. Como resultado, se cuenta con un número creciente de productos disponibles comercialmente (Butt *et al.*, 2001; Charudattan, 2001; Wraight *et al.*, 2003; Faria & Wraight, 2007) que aún no han demostrado la eficiencia esperada. La compleja organización social, la presencia de estructuras especializadas y las relaciones simbióticas con microorganismos confieren a las hormigas cortadoras ventajas adaptativas para defenderse exitosamente (Santos *et al.*, 2004; Rengifo, 2013; Ortíz, 2013). En consecuencia, la búsqueda de nuevas formas de control que superen esas defensas biológicas y de comportamiento es una prioridad.

Estudios previos documentan las asociaciones mutualistas entre las hormigas de la tribu Attini y microorganismos con actividad antibiótica y antifúngica, como una estrategia para defender a la colonia y al hongo simbionte de agentes patógenos como microhongos parásitos (Currie, 2001; Santos *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2001; Giraldo, 2009). Estas asociaciones simbióticas que ocurren al interior de las colonias de *A. cephalotes*, son, en

gran medida, responsables de la ineficiencia de los controles biológicos y químicos utilizados. En investigaciones recientes, desarrolladas por los Grupos de Investigaciones Entomológicas y GEAHNA de la Universidad del Valle, en conjunto con la Fundación CIPAV, se ha evidenciado que las obreras de *A. cephalotes* presentan comportamientos especializados para eliminar agentes patógenos que puedan significar un riesgo para la colonia (Giraldo, 2009), así como la existencia de una asociación simbiótica entre las obreras y la bacteria *Serratia marcescens* (Giraldo, 2009; Rengifo, 2012; Ortiz, 2013). Experimentalmente, se demostró que esta bacteria tiene un efecto inhibitorio sobre los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* y que puede proteger al hongo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus* (A. Möler) Singer, del efecto de hongos antagonistas. Considerando este escenario de interacciones complejas, las investigaciones en estas líneas posibilitan entender lo que sucede al interior de las colonias y reorientar la búsqueda hacia alternativas que permitan superar la barrera biológica de los simbiontes de las hormigas, como parte de una estrategia más integral de control biológico en las colonias de *A. cephalotes*.

La hipótesis planteada es que si la hormiga arriera realiza labores de limpieza que incluyen la remoción de microorganismos del material vegetal que emplean para el cultivo del hongo mutualista, y estos microorganismos, junto con otros materiales, son depositados en cámaras específicas separadas de la cámara de cultivo para evitar la contaminación de los jardines y efectos negativos sobre las obreras; entonces, los desechos pueden constituirse en reservorios de microorganismos con potencial efecto negativo sobre las colonias de *A. cephalotes*. Tomando esto en consideración, en esta investigación se evaluó el potencial

entomopatígeno y antagónico de aislados microbianos nativos procedentes de los desechos de colonias de *A. cephalotes*, con prospección para ser utilizados como parte de una estrategia de control biológico, enfatizando en la capacidad de éstos microorganismos de alterar las relaciones simbióticas existentes al interior de las colonias y su capacidad de afectar la sobrevivencia de las obreras. Se espera que los resultados derivados de esta investigación sean base para estudios posteriores encaminados a métodos de control con efecto sinérgico y que se constituyan alternativas más eficientes y eficaces en comparación con los métodos biológicos empleados hasta el momento. El desafío es continuar en la búsqueda de estrategias promisorias para el manejo agroecológico de esta plaga.

2. ANTECEDENTES

2.1 DISTRIBUCIÓN DE LA HORMIGA ARRIERA

Las hormigas cortadoras de hojas (Myrmicinae: Attini) son los principales herbívoros, exclusivos de áreas neotropicales. La tribu Attini comprende 13 géneros, siendo *Acromyrmex* y *Atta* los dos más derivados, cuyas 230 especies utilizan material fresco, proveniente de un sinnúmero de especies vegetales, en el cultivo del hongo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycete: Agaricaceae), el cual sustenta nutricionalmente a la colonia, debido a que es el recurso alimenticio de los estados inmaduros y proporciona azúcares y otros nutrientes esenciales a las obreras (Fernández, 2003; Santos *et al.* 2004; Holldobler & Wilson, 2011).

Estas hormigas se distribuyen desde el sur de los EEUU hasta el norte de Argentina, con un tope altitudinal de 3.000 msnm (Ortiz & Guzmán, 2007). En Colombia, se encuentran nueve especies de hormigas cortadoras de hojas, cuatro perteneciente al género *Atta* (*A. cephalotes*, *A. colombica*, *A. laevigata* y *A. sexdens*) y cinco a *Acromyrmex* (*Ac. aspersus*, *Ac. landolti*, *Ac. octospinosus*, *Ac. rugosus* y *Ac. coronatus*) (Mackay & Mackay 1986; Montoya-Lerma *et al.* 2006). De éstas, *A. cephalotes*, conocida localmente como hormiga arriera, es la que presenta la distribución más amplia y la que genera los mayores impactos económicos en el país. Esta especie ha invadido áreas naturales y urbanas en donde además de ser percibida como plaga agrícola, sus colonias debilitan las estructuras de ingeniería civil, construidas para mantener los lechos de los ríos. Las hormigas arrieras son responsables de hundimientos del suelo, que generan accidentes y daños en construcciones (Montoya-Lerma *et al.*, 2012).

2.2 GENERALIDADES DEL POLIMORFISMO EN *Atta cephalotes*

Las hormigas arrieras poseen una organización social considerada como una de las más complejas, lo cual favorece la realización de tareas en colaboración (Della Lucia, 2011). El polimorfismo es una característica marcada en el género *Atta*. Es posible observar variaciones importantes en tamaño y en las funciones que desempeñan las obreras, lo que hace más eficiente el trabajo y reduce el ingreso de potenciales contaminantes (Wirth *et al.*, 2003; Giraldo, 2009). La casta real, representada por el macho y la reina, está encargada de la reproducción mientras que la casta obrera la integra un grupo de obreras polimórficas

encargadas de la defensa, construcción del nido, cuidado de crías y reina, cultivo del hongo simbiote y mantenimiento de la colonia (Quiran *et al.*, 2001; Hölldobler & Wilson, 2011).

Esta especialización en las labores, contribuye a optimizar el funcionamiento de la colonia y minimizar los riesgos de transferencia de patógenos entre las obreras (Abramowski *et al.*, 2011). No obstante, Giraldo (2009) sugirió la existencia de un solapamiento de castas en la realización de algunas labores dentro de la colonia, entre las que se destaca el corte y transporte del material vegetal empleado para el cultivo del hongo simbiote. Esto podría estar relacionado con una mayor eficiencia en la remoción de microorganismos potencialmente perjudiciales para la colonia.

2.3 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A HORMIGA ARRIERA Y ESTRATEGIAS DE DEFENSA

A. cephalotes corta y transporta hasta sus nidos, material vegetal fresco, que utiliza para preparar el sustrato sobre el cual crece el hongo *L. gongylophorus* (Santos *et al.*, 2004), con el cual mantiene una relación co-evolutiva, de mutualismo obligado (Silva *et al.*, 2006). *L. gongylophorus* es un basidiomiceto de la familia Agaricaceae, cuya principal característica es la formación de gongilidios, una estructura especializada que se origina en la porción terminal de las hifas, la cual proporciona los nutrientes necesarios para alimentar principalmente las larvas (Fernández, 2003; Santos *et al.*, 2004; Holldobler & Wilson, 2011). Esta relación entre hormiga y hongo surgió hace aproximadamente 30 – 50 millones

de años (Scott *et al.*, 2010). Sin embargo, la agricultura superior en estos insectos, en la cual se mantiene el cultivo de una única especie de hongo sobre un sustrato acondicionado a partir de material vegetal fresco colectado por las obreras, es una novedad evolutiva más reciente, surgida hace 5-15 millones de años (Mueller *et al.*, 2005).

En esta asociación de mutualismo obligado, el hongo depende, exclusivamente, de la hormiga para su propagación clonal, dentro de cada colonia, así como para la formación de colonias nuevas. Sin embargo, algunos estudios reportan que, ocasionalmente, puede presentarse transferencia de inóculos del hongo entre colonias de especies simpátricas (Mueller *et al.*, 2011). Esta dependencia implica una transferencia vertical del hongo desde la colonia materna durante el vuelo nupcial, en el cual las nuevas reinas transportan en el bolsillo infrabucal un inóculo para la posterior fundación de un nuevo hormiguero, garantizando de esta manera la dispersión geográfica y la permanencia del hongo (Santos *et al.*, 2004; Schultz & Brady, 2008). Por su parte, las hormigas dependen del hongo para su alimentación, debido a que el metabolismo de los polisacáridos y compuestos recalcitrantes del material vegetal que colectan, es realizado por éste. Los jardines del hongo representan un gradiente de degradación de la biomasa vegetal, en el que se metabolizan proteínas, almidón, diferentes polímeros y toxinas de las plantas (Moller *et al.*, 2011; Aylward *et al.*, 2013).

Durante mucho tiempo se ha considerado que las hormigas arrieras presentan el más complejo y eficiente de los sistemas de monocultivo de hongos conocido (Carroll, 1990; Holldobler & Wilson, 2011) y, que además, mantienen un cultivo axénico del hongo

mutualista. Sin embargo, varias investigaciones sugieren la existencia de microorganismos contaminantes que crecen en los jardines de las colonias, generando una reducción en la disponibilidad de nutrientes para la alimentación de las hormigas (Mueller *et al.*, 2001; Currie *et al.*, 1999; Currie & Stuart, 2001).

El hongo *Escovopsis weberi* es uno de los principales parásitos especializados capaz de invadir los jardines del hongo de *Atta*, comprometiendo la productividad y la viabilidad de sus colonias (Currie, 2001; Currie *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005).

En respuesta a las presiones de selección por microorganismos competidores o parásitos, las hormigas cortadoras de hojas han evolucionado diversas estrategias para prevenir y/o controlar el crecimiento de potenciales contaminantes dentro de sus jardines (Guedes *et al.*, 2011). Dentro de estas estrategias se destacan el comportamiento social de “auto-limpieza” y “limpieza colectiva” en el que las obreras invierten tiempo y energía para garantizar la remoción mecánica de parásitos, nematodos, otros insectos, hifas y esporas de hongos (Reber *et al.*, 2011) además de un manejo eficiente de los desechos (Giraldo, 2009). Las labores de remoción de desechos se dividen entre obreras que sacan el material residual desde los jardines del hongo y los depositan en sitios específicos y obreras que se dedican exclusivamente al manejo de desechos y que los transportan desde allí hasta cámaras profundas o en pilas externas al nido, destinadas para ello (Bellari *et al.*, 2007; Waddington & Hughes, 2010).

Por otra parte, se ha registrado que las secreciones mandibulares y de la glándula metapleurale, en algunas especies de *Atta*, contienen sustancias antimicrobianas que les permiten proteger el hongo de posibles microorganismos contaminantes, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Lima-Mendoza *et al.*, 2009). En condiciones de laboratorio se demostró que las secreciones de la glándula mandibular en obreras de *A. sexdens rubropilosa*, tienen la capacidad de inhibir la germinación de esporas del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Marsaro *et al.*, 2001). De otro lado, aunque muchos estudios han demostrado que los jardines del hongo pueden presentar una variedad importante de otros microorganismos, aún se desconoce si parte de esa microbiota asociada es residente o si varía entre especies de hormigas (Scott *et al.*, 2010).

Otras estrategias evolutivas para evitar la contaminación de los jardines involucran un tercer componente biológico dentro de la relación simbiótica. En nidos de *A. sexdens* se ha encontrado asociada la bacteria *Pseudonocardia* (Actinomycete) que se considera como la principal defensa frente a *Escovopsis* (Currie, 2001). Igualmente, se han encontrado las bacterias *Streptomyces* y *Burkholderia* asociadas con *Acromyrmex octospinosus* (Currie *et al.*, 2003) y *A. sexdens* (Santos *et al.*, 2004), respectivamente. El principal beneficio para la hormiga es la producción, por parte de la bacteria, de agentes antifúngicos que inhiben la germinación de conidias de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* (Santos *et al.*, 2004). Estas asociaciones con bacterias como exosimbiontes, se explican principalmente por la producción de compuestos antimicrobianos, cuya identidad podría estar implicada en la selección y adquisición de estos simbiontes (Seipke *et al.*, 2011).

Para Colombia hasta hace poco se desconocía la presencia de microorganismos asociados a *A. cephalotes*, como un tercer componente simbiótico con equivalencia ecológica a lo registrado en otras especies de hormiga arriera. Sin embargo, recientes investigaciones de Giraldo (2009), sugieren la existencia de una compleja asociación de bacterias y levaduras con las diferentes castas de *A. cephalotes* en colonias mantenidas en condiciones de laboratorio. Esta investigadora destacó la dominancia y persistencia de *Serratia marcescens*, una Enterobacteriaceae gram-negativa, en todas las subcastas.

S. marcescens, se caracteriza por su capacidad de producir un pigmento rojo denominado prodigiosina (Tanada & Kaya, 1993; Deorukhkar *et al.*, 2007) y por poseer entre muchas propiedades, actividad antibacterial y antimicótica (Patil *et al.*, 2011). Esto permite inferir que la presencia de *S. marcescens* en el cuerpo de las hormigas puede estar relacionado con una función protectora frente a microorganismos patógenos y contaminantes (Giraldo, 2009), aspecto evaluado experimentalmente por Rengifo (2012) y Ortíz (2013). Ellos demostraron que *S. marcescens* tiene un efecto negativo sobre los hongos *Mucor* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Rengifo, 2012) y que limita el crecimiento de los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y del antagonista *T. harziarium*, usados comercialmente para el control biológico de hormiga arriera en Colombia (Ortíz, 2013).

2.4 CONTROL DE LA HORMIGA ARRIERA

En la actualidad, debido a su múltiple importancia, las hormigas cortadoras de hojas son objeto de preocupación, en particular, por su hiper-abundancia, como consecuencia del

incremento acelerado de áreas fragmentadas durante los últimos años. Los impactos evidentes y las pérdidas que ocasionan a cultivos, ornamentales, pastizales y árboles de importancia forestal en áreas rurales y urbanas hacen que se consideren plagas de importancia económica (Fernández & Jaffé, 1995; López & Orduz, 2004; Montoya-Lerma *et al.*, 2012).

La incursión del control con base en insecticidas químicos durante la mitad del siglo veinte generó la creencia de que las arrieras podían ser eliminadas. Desde entonces, el uso irracional e indiscriminado de una variedad de productos, ha ocasionado un significativo daño ambiental. Por ejemplo, los productores agropecuarios aplican directamente en los nidos o preparados como cebos con clorpirifos y sulfuramidas, insecticidas que tienen restricciones de uso, debido principalmente a sus efectos adversos sobre organismos acuáticos de vida corta y su riesgo para salud humana (Della Lucia, 2003; Godoy *et al.*, 2005). En general, el resultado ha sido poco efectivo, debido a la compleja organización social de las hormigas, la capacidad adaptativa y las estrategias biológicas y de comportamiento. Las hormigas logran sobreponerse a los ataques, manejar en forma eficiente el ingreso de casi todos los contaminantes a la zona del hongo simbionte y restablecer el funcionamiento normal de la colonia en corto tiempo (Diamond, 1998; Mueller *et al.*, 2001; Currie & Stuart, 2001).

En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de nuevas estrategias, dirigidas al manejo integrado de plagas (MIP), entre las que se destaca el control biológico con agentes microbianos como parte importante. La alta especificidad, relativo bajo costo y bajo riesgo

ambiental, posicionan estas estrategias como alternativas con mucha potencialidad (Santos *et al.*, 2007). Para el caso de la hormiga arriera, a nivel de laboratorio, algunos estudios han demostrado una disminución significativa en el crecimiento del hongo *L. gongylophorus* en pruebas de antagonismo con otros hongos.

Silva *et al.* (2006) registraron la susceptibilidad de *L. gongylophorus*, frente a diferentes micro-hongos aislados de colonias naturales y artificiales de *A. sexdens rubropilosa*, entre ellos, *T. harzianum*, varias cepas de *Escovopsis weberi* y *Acremonium kiliense*. Todos los microorganismos presentaron actividad inhibitoria sobre el hongo simbionte al cabo de 15 días, pero *T. harzianum* y una de las cepas de *E. weberi* fueron las de mayor efecto con inhibición del 75 y 68%, respectivamente. Por su parte, Folgarait *et al.* (2011), confirmaron la susceptibilidad del hongo simbionte, en ensayos de enfrentamiento, frente a *E. weberi* y *Lecanicillium lecanii*, aislados de colonias de *Ac. lundii*.

Algunos hongos entomopatógenos han sido empleados como controladores naturales de hormiga arriera, en áreas agrícolas afectadas por este insecto (Hajek & St.Leger, 2007; Rodriguez *et al.*, 2008). En particular se destacan especies de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, con las que se ha obtenido relativo éxito en el control de la hormiga roja, *Solenopsis invicta*, (Brinkman & Gardner, 2000); en colonias de *Atta sexdens* se demostró efecto entomopatógeno empleando cebos con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Santos *et al.*, 2007).

En Cuba, Pérez (2002) obtuvo, en nidos de *A. insularis*, una disminución superior al 90%, utilizando *B. bassiana* en la elaboración de cebos. Igualmente, López y Orduz (2003) formularon cebos que contenían una mezcla de *M. anisopliae* y *T. viride*, lo cual produjo una mortalidad del 100% en nidos de *A. cephalotes* en condiciones de laboratorio y campo. Escobar *et al.* (2002), en un estudio similar en la región del Chocó, encontraron que la aplicación de hongos comerciales de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *T. lignorum*, en forma de cebos preparados con hojuelas de avena y jugo de naranja, disminuía la actividad de forrajeo de *A. colombica* y *A. cephalotes* desde la primera a la séptima semana después de la aplicación; sin embargo, posteriormente la actividad se reanudó con intensidad, lo que sugiere un efecto transitorio de las preparaciones aplicadas en forma de cebo.

Pese a estos hallazgos, en general, la aplicación de productos biológicos en condiciones naturales no ha alcanzado una efectividad alta, debido en parte, a la gran adaptabilidad que le permite a las hormigas arrieras defenderse de los agentes empleados para su control (Santos *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos entomopatógeno y antagónico de aislados microbianos nativos como potenciales agentes de control biológico de la hormiga arriera, *Atta cephalotes*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto antagónico de aislados microbianos procedentes de los desechos de colonias de *Atta cephalotes*, sobre el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* y la bacteria simbiote *Serratia marcescens*.

Evaluar, en condiciones de laboratorio, la capacidad entomopatógena de aislados microbianos procedentes del material de desecho, sobre obreras medianas de *A. cephalotes*.

Determinar la capacidad de coexistencia de los aislados microbianos con antagonismo sobre los microorganismos simbiotes y actividad entomopatógena sobre hormigas obreras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de hormiga arriera ubicado en la microestación biológica del Departamento de Biología, en la Universidad del Valle, sede Meléndez, situada en la ciudad de Cali, a 1.070 msnm, con temperatura y humedad relativa promedios de 24°C y 75%, respectivamente.

4.2 COLECTA DE NÚCLEOS DE HORMIGA ARRIERA, *A. cephalotes*

Con el fin de obtener los aislamientos de los microorganismos simbioses y contar permanentemente con obreras para las pruebas de patogenicidad, se establecieron y mantuvieron colonias de hormiga arriera en condiciones de laboratorio. Entre febrero y mayo de 2012 se colectaron núcleos de colonias de *A. cephalotes* en el casco urbano de Cali, en los barrios El Ingenio y Multicentro, al igual que en la zona rural de vereda Los Andes.

Durante la colecta se tomó la mayor cantidad posible de obreras y de hongo simbionte, con el fin de asegurar la sobrevivencia de las colonias. Su mantenimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de Valderrama *et al.* (2006). Diariamente, se les proporcionó avena en hojuelas y hojas frescas de diferentes especies vegetales, usualmente forrajeadas por las obreras, entre ellas: *Caesalpinia pluviosa* (Fabaceae), *Leucaena leucocephala* (Fabaceae), *Guarea guidonia* (Meliaceae), *Manguifera indica* (Anacardiaceae) y *Lactuca sativa* (Asteraceae).

En cada colonia se demarcaron tres zonas: forrajeo, jardín del hongo simbionte y depósito de desechos, con el propósito de facilitar la toma de muestras, datos y observaciones.

4.3 OBTENCIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS

Con el propósito de realizar los aislamientos de microorganismos a partir de los desechos, las colonias de *A. cephalotes*, mantenidas en laboratorio, se alimentaron con material vegetal fresco proveniente de árboles a libre exposición, garantizando el ingreso de microorganismos que pudieran ser transportados por las obreras hacia las cámaras de desechos. A partir de cinco colonias de hormiga, se colectaron muestras de 10 gramos de desechos para el análisis microbiológico, realizando diluciones seriadas hasta 10^{-6} y posteriores siembras en medios de cultivo referenciados para hongos (Papa Dextrosa Agar - PDA y Sabouraud Dextrosa Agar –SDA con gentamicina a una concentración de 50mg/L). Para el cultivo de bacterias heterótrofas totales se utilizó Agar Nutritivo (AN). Las siembras se hicieron por el método de vertido en placa siguiendo las recomendaciones del Standard Methods (APHA, 2005).

La incubación para bacterias se hizo durante 2-3 días, a 35°C, mientras que para hongos fue de 5-7 días a temperatura ambiente. Este procedimiento fue repetido dos meses después, utilizando las mismas colonias de hormiga arriera mantenidas en laboratorio. Mediante el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) se determinó la abundancia de hongos y bacterias heterótrofas totales para cada muestra.

Posterior a la incubación, en cada análisis por separado, se describieron las características macroscópicas de las diferentes cepas de hongos y bacterias con un recuento alto y se determinó la abundancia para cada uno de ellos (UFC/g). Cada cepa diferente fue re-

sembrada hasta obtener cultivos puros, los cuales se mantienen en el cepario en el laboratorio de hormiga arriera. Con el fin de diferenciar los aislados de bacterias y levaduras, a cada uno de ellos se le realizó un montaje con coloración simple y de Gram, con el fin de evaluar sus características microscópicas y verificar su correspondencia con un aislado bacteriano. Esto se hizo, debido a que el criterio inicial de escogencia fueron las características macroscópicas de las colonias, por lo que sólo con una evaluación microscópica fue posible discriminar entre bacterias y levaduras. Para los ensayos posteriores se incluyeron únicamente aislados de hongos filamentosos y bacterias.

Cada aislado fue codificado indicando el número del aislamiento y la procedencia. Para los ensayos se seleccionaron los aislados con los mayores valores de abundancia para hongos y bacterias. Estos microorganismos fueron utilizados para realizar las pruebas de antagonismo sobre el hongo mutualista *L. gongylophorus* y sobre la bacteria simbiote *S. marcescens*. Además, se ensayó su capacidad insecticida sobre obreras medianas de hormiga arriera en condiciones de laboratorio. Como obreras medianas se consideraron aquellas hormigas con un tamaño de la capsula cefálica entre 2,1 mm y 4,3 mm de ancho.

4.4 AISLAMIENTO DEL HONGO SIMBIONTE

El aislamiento del hongo *L. gongylophorus* se hizo a partir de las cámaras de cultivo de las colonias de hormiga arriera, mantenidas en la microestación de la Universidad del Valle. Bajo condiciones de asepsia, se separaron inicialmente, fragmentos de la porción media del

hongo de la cámara de cultivo y, posteriormente, se eliminaron todas las hormigas para minimizar la contaminación. Una vez se tuvo el hongo libre de hormigas, se sembraron fragmentos de aproximadamente 5mm en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, Merck®) y agar nutritivo (AN Merck®), preparado en cruz para dirigir el crecimiento del hongo en el centro de la caja Petri y los posteriores ensayos de enfrentamiento con los microorganismos contaminantes. El hongo se dejó crecer a temperatura ambiente durante los 15 días previos a los enfrentamientos (Rengifo, 2012).

4.5 PRUEBAS DE ANTAGONISMO SOBRE EL HONGO SIMBIONTE

En los extremos del medio en cruz (PDA o AN), se realizó la inoculación de los microorganismos seleccionados (nueve aislados de bacterias y nueve de hongos) con el hongo mutualista en el centro del medio de cultivo. La inoculación de estos microorganismos se realizó a los 15 días de la siembra del simbionte, para asegurar su estabilidad y crecimiento.

Después de la inoculación, se tomó la medida diaria del crecimiento (diámetro en milímetros) del mutualista, durante diez días. Además, en forma paralela, se evaluó el crecimiento del hongo sin presencia de otro microorganismo (control). El efecto de los microorganismos contaminantes sobre el hongo mutualista se estimó a través de la eficiencia de crecimiento, mediante la fórmula $EC = DF/DI$, en la cual la eficiencia de crecimiento (EC) es la relación de los diámetros final (DF) e inicial (DI) de la colonia. Para hallar el porcentaje de inhibición, se estimó el crecimiento relativo (CR) del simbionte en

presencia de los microorganismos evaluados (Ct), respecto al control (Cc), mediante la fórmula $CR = Ct/Cc$. Posteriormente, se restó este valor a la unidad y se expresó en términos de porcentaje (modificado de Silva *et al.*, 2006). Los ensayos con cada microorganismo contaminante se hicieron de manera independiente y con quince repeticiones por tratamiento.

4.6 PRUEBAS DE ANTAGONISMO SOBRE *Serratia marcescens*

Para estos ensayos, se utilizó una cepa *S. marcescens* aislada de las obreras de colonias mantenidas en el laboratorio, previamente caracterizada por pruebas bioquímicas. Las pruebas de enfrentamiento con los aislados bacterianos se realizaron por el método de difusión en disco, utilizando papel filtro Watman No1. Para esto, *S. marcescens* se sembró en superficie en agar nutritivo, partiendo de una población de 1×10^8 UFC/mL, ajustada con una escala de MacFarland. Posteriormente, por cada caja de Petri se colocaron cuatro discos impregnados con la bacteria a evaluar, preparada igualmente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Se incluyeron los respectivos controles, en los cuales los discos se impregnaron con solución estéril, la misma utilizada para la suspensión de bacterias. Luego de 48 horas de incubación a 35°C, se midió el diámetro de los discos, incluyendo la zona correspondiente al halo de inhibición, en caso de que éste se presentara. Para cada uno de los tratamientos se hicieron siete repeticiones.

Por otra parte, los enfrentamientos con los aislados de hongos filamentosos, se hicieron sembrando la bacteria *S. marcescens* en la superficie del medio TSA (agar tripticasa soya) con glucosa al 2%, con el fin de favorecer el crecimiento tanto de la bacteria como de los hongos. Se empleó la misma población que para los ensayos anteriores. Sobre el medio inoculado con la bacteria, se dispusieron cuatro discos de 0,7 cm de diámetro con micelio previamente crecido sobre TSA-Glucosa, de cada uno de los aislados de hongos a evaluar. Igualmente, se realizaron las mediciones del diámetro de los discos, incluyendo la zona de inhibición de crecimiento. Cada uno de los tratamientos tuvo siete repeticiones, incluyendo los controles, en los que se utilizaron discos de medio sin micelio.

4.7 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD SOBRE OBRERAS DE *A. cephalotes*

Por otra parte, se evaluó el efecto insecticida de los diez aislados de bacterias y diez de hongos filamentosos más abundantes, sobre obreras medianas. Para las pruebas, se prepararon soluciones a una concentración de $1,0 \times 10^7$ conidios/mL de cada uno de los hongos, a partir de cultivos jóvenes esporulados de entre 6-9 días, utilizando para el conteo, una cámara de Neubauer. Por su parte, para las pruebas con bacterias, se preparó de cada aislado una solución a una concentración de $3,0 \times 10^9$ UFC/mL en la escala de MacFarland. Los microorganismos fueron ofrecidos a las hormigas por dos métodos: contacto e ingesta. Sólo obreras medianas obtenidas de los nidos establecidos en el laboratorio fueron usadas en estas pruebas. Para cada hongo y cada bacteria a evaluar por el método de contacto, se dispusieron por separado, 400 μ L de la solución en una caja de Petri, colocando luego 15 obreras extraídas de la misma colonia, previamente adormecidas por frío, con el fin de

garantizar el contacto con la solución. Para cada tratamiento, incluyendo el control (contacto con solución estéril), se utilizaron siete unidades experimentales (repeticiones). El contacto con las soluciones se realizó una vez al inicio del experimento y los datos de mortalidad fueron registrados diariamente durante 15 días. Durante las evaluaciones los insectos se alimentaron con una dieta artificial a base de agar, suministrada cada 48 horas.

En los ensayos por ingesta se preparó una dieta sólida a base de agar, peptona bacteriológica, extracto de levadura y glucosa (Bueno *et al.*, 1997) con las mismas concentraciones de cada microorganismo que fueron utilizadas en los ensayos por contacto. Se suministraron raciones iguales (1cm x 1cm x 0,7cm) a siete unidades experimentales de 15 obreras, suministrando nuevamente esta dieta con microorganismo cada 48 horas. Como control se usaron unidades de 15 obreras alimentadas con dieta sin microorganismo. En cada tratamiento, se calculó la mortalidad acumulada diaria corregida de Abbott (Cañedo & Ames, 2004) durante quince días.

Para los ensayos por contacto e ingesta, cada hormiga muerta se colocó en cámara húmeda, previamente desinfectada externamente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,7%. A los 2, 3 y 5 días se hicieron observaciones al estereomicroscopio para confirmar la colonización por parte de los microorganismos evaluados y determinar el porcentaje de colonización.

Los aislamientos que presentaron los mayores valores de mortalidad, se utilizaron para repetir estos ensayos en el tiempo, en los que se incluyó como controles positivos pruebas

con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, cepas cedidas por la empresa Biprotección SAS. En total, se hicieron 332 ensayos en los que se utilizaron 4.980 obreras.

Los datos de mortalidad fueron registrados durante quince días consecutivos, basados en datos experimentales que demostraron que las obreras pueden sobrevivir más de veinte días cuando se extraen de las colonias y son alimentadas con la dieta a base de agar (Castaño-Quintana *et al.*, 2013). No obstante, para los análisis sólo se consideraron los datos registrados hasta el décimo día, debido a que los tratamientos control superaron el 30% de mortalidad después de este tiempo.

4.8 PRUEBAS DE COEXISTENCIA ENTRE MICROORGANISMOS CON EFECTO ANTAGÓNICO Y/O INSECTICIDA

Con el fin de identificar la potencialidad de realizar mezclas viables de los hongos y bacterias con efecto insecticida y/o antagónico, se hicieron ensayos de enfrentamiento entre estos microorganismos. Previo a esto, los aislados bacterianos fueron caracterizados inicialmente a nivel morfológico y en su comportamiento frente a la tinción diferencial de Gram. Posteriormente, mediante pruebas bioquímicas se determinó su compatibilidad hasta género. Por otra parte, los hongos fueron caracterizados a nivel macro y microscópico para determinar la compatibilidad con especies referenciadas. Para esto, se utilizaron las claves de Barnett & Hunter (2003).

Para las pruebas de enfrentamiento, se reactivaron los aislamientos de hongos y bacterias que, en evaluaciones previas, demostraron el efecto deseado. Se realizaron todas las combinaciones posibles de enfrentamiento por pares de microorganismos. Para el enfrentamiento entre hongos, se colocaron discos de 0,7 cm con micelio previamente crecido de los hongos a enfrentar, en medio AS, separados entre sí por una distancia de 3,0 cm. Para cada hongo se incluyó el tratamiento control, que consistió en la siembra de discos con micelio sin ningún enfrentamiento. Después de cuatro y seis días, se tomaron las medidas del diámetro del crecimiento de cada hongo y se calculó la eficiencia de crecimiento, como la relación del diámetro final y el inicial.

Por otra parte, para los enfrentamientos entre bacterias y hongos, se utilizó medio TSA con glucosa al 2% para favorecer el crecimiento de los hongos y de las bacterias al mismo tiempo. Se colocaron discos de 0.7cm de diámetro con micelio crecido de cada hongo sobre la superficie del medio. Posteriormente, se sembró un inóculo de la bacteria a enfrentar a una distancia de 1,5 cm del disco en dos direcciones, en forma de ele (L). Pasados cuatro y seis días se tomaron las medidas del crecimiento en diámetro de los hongos y se calculó la eficiencia de crecimiento para cada uno. Para las bacterias no se obtuvo un dato cuantitativo, por lo que se utilizó la observación de las características macroscópicas de crecimiento como criterio para determinar un posible efecto de los hongos sobre éstas.

Los enfrentamientos entre bacterias se hicieron siguiendo la misma metodología descrita para las pruebas de antagonismo sobre *S. marcescens*.

Para cada prueba de enfrentamiento se hicieron seis repeticiones, de igual manera que los ensayos con los controles, para un total de 209 ensayos.

4.9 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para cada prueba por separado, se construyeron matrices de datos utilizadas para los análisis gráficos y estadísticos. Al aplicar pruebas estadísticas paramétricas, inicialmente se evaluó el cumplimiento de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas para cada conjunto de datos por separado. En ningún caso se cumplieron estos supuestos a pesar que se transformaron varias veces, aplicando diferentes métodos de acuerdo con la naturaleza de los datos; en consecuencia, se optó por aplicar pruebas no paramétricas.

Para los datos registrados en los ensayos de capacidad antagónica sobre el hongo mutualista y sobre *S. marcescens*, al igual que para los datos obtenidos en las pruebas de coexistencia, se utilizó la prueba de U Mann-Whitney para grupos independientes, con un nivel de significancia α de 0.05. Los datos de porcentaje de mortalidad acumulada diaria corregida, en los ensayos por ingestión y contacto fueron analizados mediante pruebas para medidas repetidas en el tiempo de Friedman (ANOVA de Friedman) con un nivel de significancia α de 0.05. Además, para determinar diferencias entre cada tratamiento y los controles, se aplicaron pruebas pareadas de rangos de Wilcoxon. Estos análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico Statistics 7.0 (Statsoft, 2007).

5. RESULTADOS

5.1 ABUNDANCIA DE HONGOS Y BACTERIAS HETERÓTROFAS EN DESECHOS DE COLONIAS DE *A. cephalotes*

En las dos evaluaciones realizadas, las poblaciones de bacterias heterótrofas totales fueron superiores a las poblaciones de hongos, en todas las muestras evaluadas. Así mismo, no se observó una fluctuación marcada en las abundancias de estos dos grupos microbianos entre los dos períodos (tabla 1). Por otra parte, se pudo observar una riqueza alta, en términos del número de cepas microbianas encontradas en el material de desechos de las cinco colonias utilizadas en estas evaluaciones. En total, se encontraron 42 cepas de hongos y 28 de bacterias (previamente verificado microscópicamente). Sin embargo, muchos de éstos, presentaron valores muy bajos de abundancia, por lo cual no fueron considerados en esta investigación.

Tabla 1. Valores promedio de abundancia (UFC/g) de hongos y bacterias heterótrofas totales en los desechos de las colonias de *A. cephalotes* para los dos tiempos de evaluación.

Colonia de <i>A. cephalotes</i>	Primera evaluación		Segunda evaluación	
	Abundancia de hongos (UFC/g)	Abundancia de bacterias heterótrofas totales (UFC/g)	Abundancia de hongos (UFC/g)	Abundancia de bacterias heterótrofas totales (UFC/g)
ACU 06101 - 01	$3,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	$5,3 \times 10^8$
ACU 06102 - 02	$4,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	$5,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^9$
ACU 06106 - 03	$1,7 \times 10^8$	$5,1 \times 10^9$	$8,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$
ACU 03117 - 04	$7,6 \times 10^7$	$6,3 \times 10^9$	$2,7 \times 10^7$	$4,4 \times 10^8$
ACU 03115 - 05	$5,8 \times 10^8$	$7,4 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$

A cada cepa, se le determinó la frecuencia de aparición en cada colonia y en cada ensayo, a partir de la proporción de veces que fue aislado de cada colonia. Los valores de frecuencia, presentaron poca variación con respecto al tiempo y a las colonias (tabla 2), lo cual demuestra la persistencia de estos aislados. Las cepas de hongos y bacterias que se seleccionaron para los ensayos posteriores, fueron aquellos que presentaron los valores más altos de abundancia, respecto a la abundancia total de hongos y bacterias heterótrofas, en las dos evaluaciones (tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio de abundancia (UFC/g) y frecuencia de los aislados de hongos y bacterias seleccionadas para los ensayos de capacidad antagónica y entomopatógena.

Aislados microbianos	Primera evaluación		Segunda evaluación	
	Abundancia promedio (ufc/g)	Frecuencia (%)	Abundancia promedio (ufc/g)	Frecuencia (%)
DHH-014	2,2x10 ⁴	60	3,1x10 ³	80
DHH-021	3,9x10 ³	100	4,1x10 ²	80
DHH-143	<30	40	1,4x10 ⁴	60
DHH-150	5,2x10 ⁴	100	6,7x10 ³	100
DHH-155	4,6x10 ³	60	3,3x10 ³	80
DHH-203	3,8x10 ³	40	4,2x10 ²	40
DHH-264	6,1x10 ³	40	8,3x10 ¹	40
DHH-290	1,3x10 ⁴	60	6,4x10 ³	80
DHH-332	1,7x10 ³	80	<30	60
DHH-444	4,8x10 ³	80	2,5x10 ⁴	60
DHB-001	6,4x10 ²	80	2,3x10 ³	100
DHB-012	5,4x10 ²	40	3,2x10 ²	60
DHB-221	5,5x10 ³	80	2,2x10 ⁴	60
DHB-279	6,3x10 ³	40	4,5x10 ²	40
DHB-338	2,2x10 ⁴	60	6,3x10 ²	40
DHB-371	1,3x10 ⁴	40	2,9x10 ³	60
DHB-409	7,2x10 ²	60	5,6x10 ²	80
DHB-410	5,7x10 ²	80	9,4x10 ¹	40
DHB-441	3,5x10 ³	80	<30	40
DHB-501	3,4x10 ⁴	60	4,8x10 ³	80

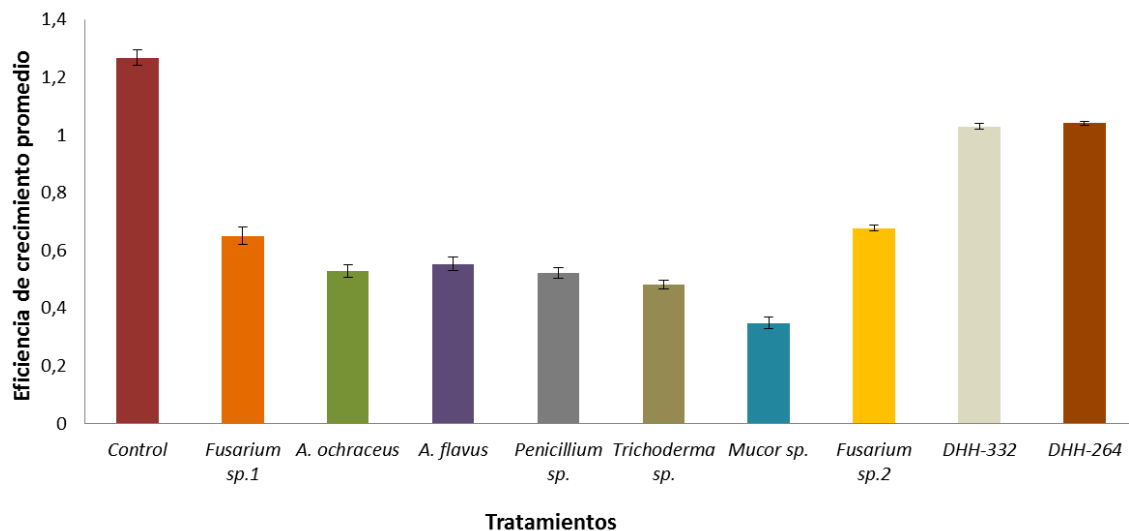
DHH= aislado de hongos; DHB= aislado de bacteria, esto según clasificación utilizada en el cepario del laboratorio de hormiga arriera de la Universidad del Valle.

Vale la pena resaltar que DHB-001 demostró compatibilidad morfológica y bioquímica con *Serratia marcescens*, la cual presentó valores altos de abundancia en los desechos y se encontró en una frecuencia del 80% y 100% de las colonias en la primera y la segunda repetición en el tiempo. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió incluir esta bacteria en los ensayos de capacidad insecticida, a pesar de su asociación de tipo simbiótico con la hormiga arriera *A. cephalotes* del Valle del Cauca (Giraldo 2009; Rengifo 2011), lo cual podría ser importante para avanzar en la comprensión de las implicaciones de esta bacteria para la protección de las hormigas.

5.2 ANTAGONISMO SOBRE EL HONGO *L. gongylophorus*

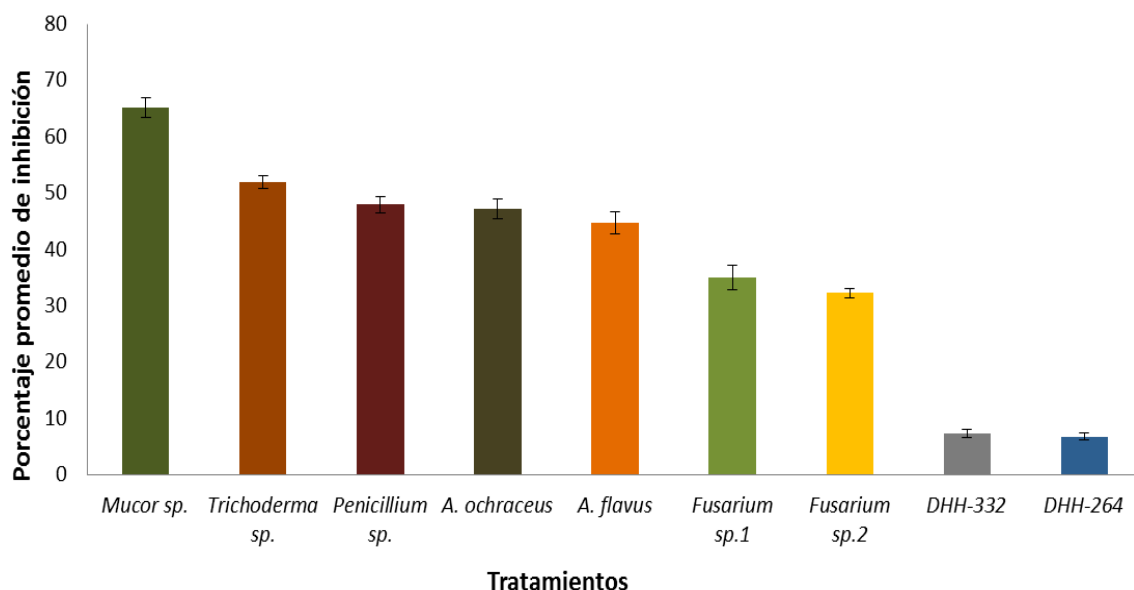
Se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la eficiencia de crecimiento de *L. gongylophorus* sin ningún enfrentamiento, con cada uno de los diferentes tratamientos ($U=11,00$; $p < 0,05$). Los hongos que tuvieron un efecto de antagonismo fueron compatibles con *Aspergillus ochraceus* (DHH-444), *Aspergillus flavus* (DHH-014), *Penicillium* sp. (DHH-150), *Trichoderma* sp. (DHH-155), *Mucor* sp. (DHH-021) y dos cepas del género *Fusarium*: *Fusarium* sp.1 (DHH- 290) y *Fusarium* sp. 2 (DHH -203) (figura 1).

Figura 1. Eficiencia de crecimiento promedio del hongo mutualista en los diferentes tratamientos de enfrentamiento con los aislados de hongos. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.



Los porcentajes promedios de inhibición del hongo simbiote fueron significativamente altos, siendo el mayor valor para *Mucor* sp. con un 65,18%, seguido por *Trichoderma* sp. con 51,94%. Por su parte, las dos especies de *Aspergillus* tuvieron un efecto similar con inhibición del 47,29% y 44,76% en *A. ochraceus* y *A. flavus*, respectivamente. De igual forma, para las dos cepas de *Fusarium*, se observaron porcentajes muy similares de inhibición: 34,98% para *Fusarium* sp.1 y 32,30% para *Fusarium* sp.2. Los aislados que no tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de crecimiento, presentaron valores de inhibición que no superaron el 7,50% (figura 2).

Figura 2. Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento del hongo simbionte en los tratamientos de enfrentamiento con los aislados de hongos. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.



Cabe resaltar que en el enfrentamiento con *Mucor* sp., se presentó una reducción del tamaño del hongo simbionte (65% de reducción respecto al tamaño inicial) a partir del tercer día de tratamiento. Además, macroscópicamente se observó en cerca del 80% de las réplicas, cambios en su aspecto y coloración, como resultado de la muerte del simbionte. Para corroborar esto, se tomó un inóculo y se re-sembró en medio PDA y se determinó su viabilidad. Además, se hizo montaje en fresco, con el fin de evaluar el estado de las estructuras. En ningún caso hubo evidencia de viabilidad y, microscópicamente, las estructuras (gongilidios) presentaron ruptura en sus paredes. Por el contrario, en los tratamientos de enfrentamiento con los otros aislados, no se observaron características relacionadas con la pérdida de viabilidad, a pesar de que se evidenció un cese en el

crecimiento del simbionte e invasión por parte del micelio de los hongos con que se enfrentó.

Por otra parte, en los ensayos de enfrentamiento con los aislados de bacterias, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; $U=4,00$) en la eficiencia de crecimiento de *L. gongylophorus* respecto al tratamiento control, para dos aislados (figura 3). Éstos (DHB-279 y DHB-409) fueron morfológica y bioquímicamente compatibles con dos cepas dentro del género *Bacillus*, en adelante denominadas *Bacillus* sp.1 (DHB-279) y *Bacillus* sp.2 (DHB-409), respectivamente. En los demás tratamientos no se encontraron diferencias significativas en comparación con el control ($p > 0,05$) y las características macroscópicas del hongo simbionte fueron similares entre estos tratamientos y el control. Además, se mantuvo la viabilidad, sin daño en la estructura del micelio ni en los gongilidios (figura 4).

Figura 3. Eficiencia de crecimiento promedio del hongo mutualista en los diferentes tratamientos de enfrentamiento con los aislados bacterianos. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.

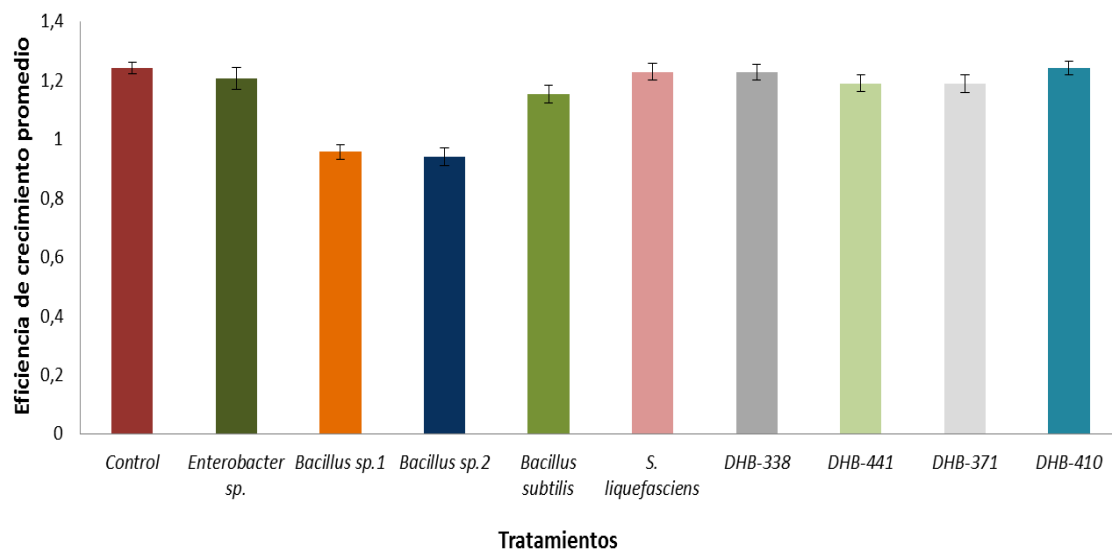
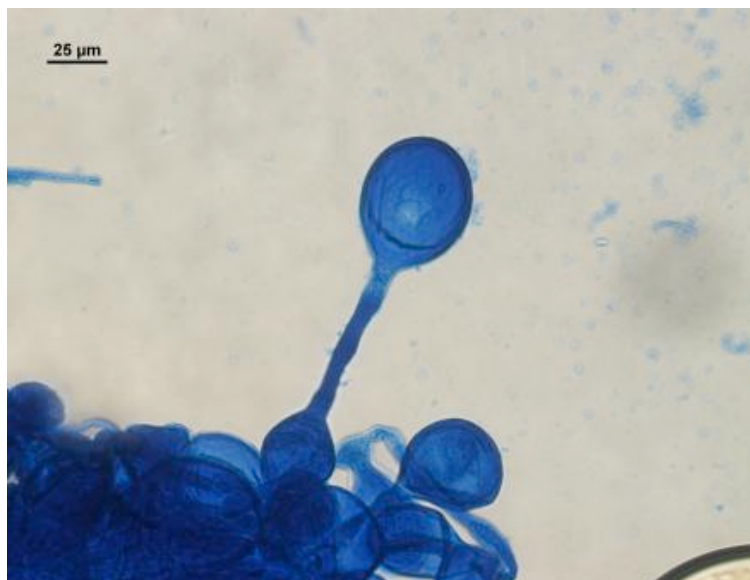
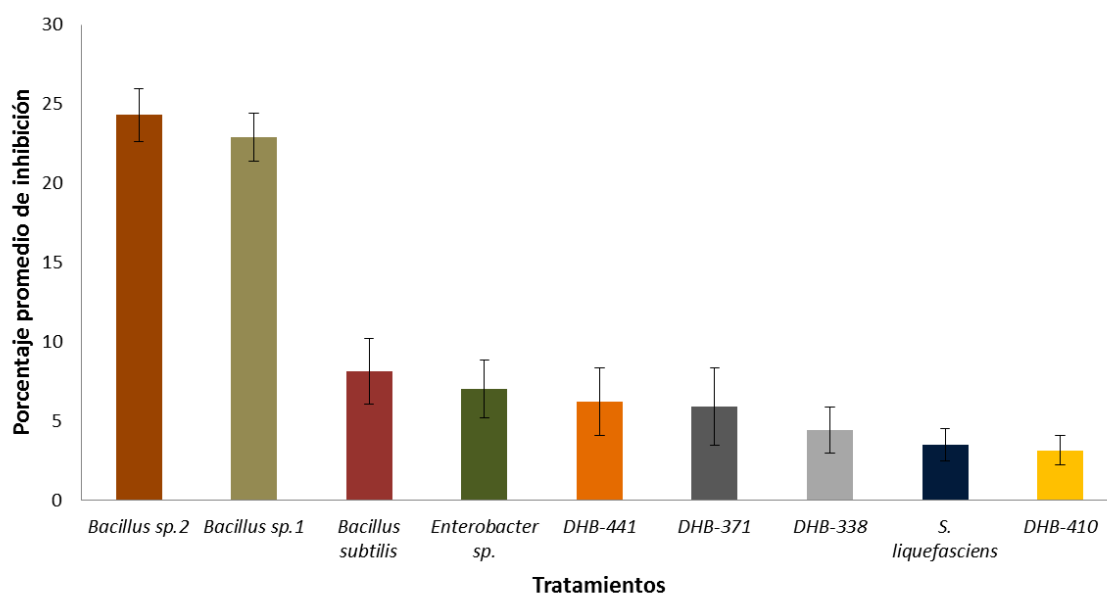


Figura 4. Microfotografía de gongilidios inalterados de *L. gongylophorus*. Tinción con azul de lactofenol (100x).



En cuanto a la capacidad de las bacterias aisladas de desechos para reducir el crecimiento del hongo mutualista en términos de porcentaje de inhibición, los mayores valores fueron registrado en los tratamientos con *Bacillus* sp.1 y *Bacillus* sp.2, con un 24,30% y 22,90%, respectivamente. En los demás tratamientos, el promedio de inhibición no superó en ningún caso el 8,00% (figura 5).

Figura 5. Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento del hongo simbiote en los tratamientos de enfrentamiento con los aislados de bacterias. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.

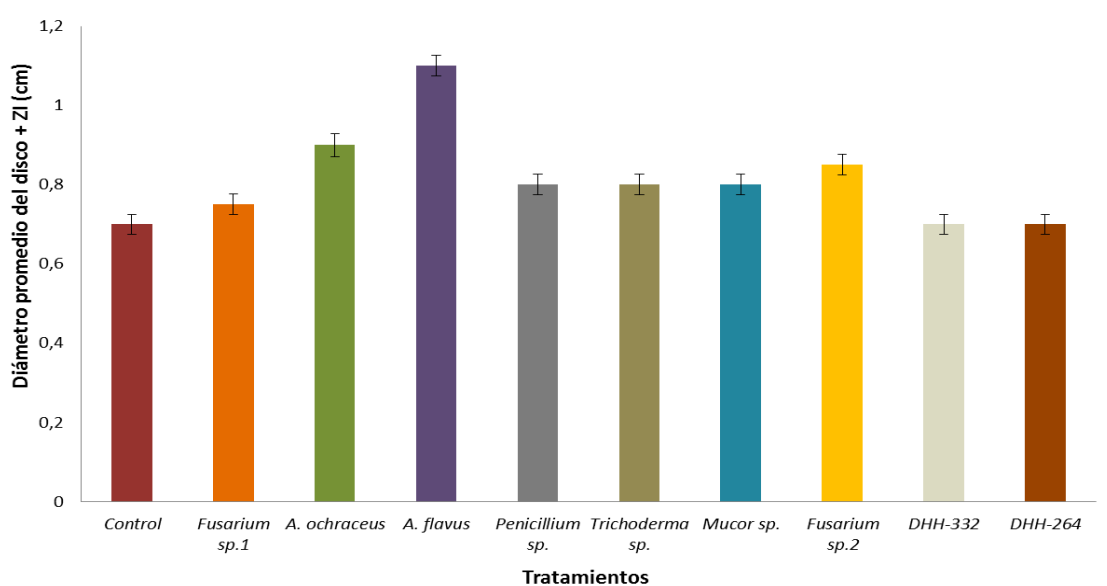


Es importante anotar que en estos ensayos no se incluyó a *Serratia marcescens* (aislado DHB-001) debido a que, en investigaciones recientes, se corroboró que esta bacteria no afecta negativamente el crecimiento de *L. gongylophorus* y, en ocasiones, por el contrario favorece su crecimiento (Rengifo, 2013; Ortiz, 2013).

5.3 ANTAGONISMO SOBRE LA BACTERIA *S. marcescens*

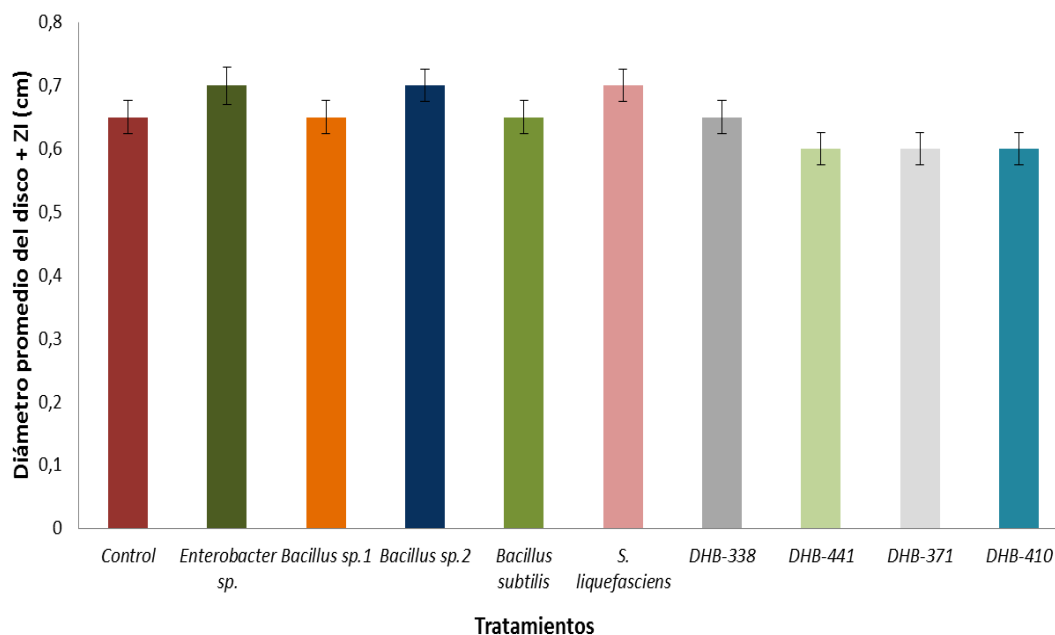
Los resultados de las pruebas de enfrentamiento con los aislados de hongos, evidencian que sólo *A. flavus* tuvo un efecto estadísticamente negativo sobre el crecimiento de *S. marcescens* ($U=5,50$; $p=0,00003$) en la medida promedio del diámetro del disco (incluyendo la zona de inhibición de crecimiento de la bacteria) en comparación con el control (figura 6). Además, en el área más próxima a la zona de crecimiento del micelio del hongo, la bacteria no produjo la pigmentación roja típica sino una coloración roja tenue. En los demás tratamientos, no se evidenció la presencia de zona de inhibición de crecimiento alrededor del micelio de los hongos y la bacteria no presentó cambios en su patrón de coloración.

Figura 6. Medida promedio del diámetro del disco en los enfrentamientos entre los hongos y *S. marcescens*. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.



En los enfrentamientos con los aislados bacterianos, no se evidenciaron diferencias significativas respecto al control ($p > 0,05$) (figura 7) y en ningún caso se observaron cambios en las características macroscópicas de *S. marcescens*.

Figura 7. Medida promedio del diámetro del disco en los enfrentamientos entre las bacterias y *S. marcescens*. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.



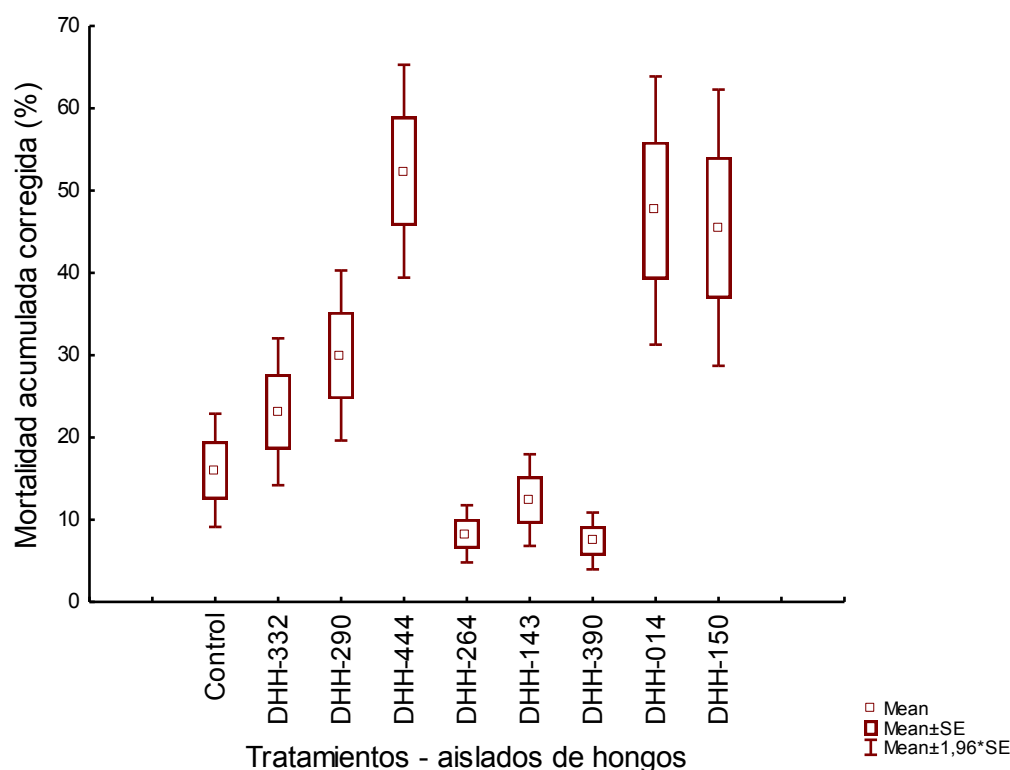
5.4 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD SOBRE OBRERAS DE *A. cephalotes*

5.4.1 Evaluación del potencial insecticida de los aislados de hongos

En la primera evaluación de la capacidad insecticida de los aislados de hongos suministrados en la dieta, el promedio de la mortalidad acumulada diaria corregida fue

significativamente diferente entre los tratamientos (ANOVA χ^2 (N=10, df=8)= 65,92 p=0,00000) (figura 8).

Figura 8. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de hongos (primera repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman (N= 10, df = 8) = 65,92 p=0,00000.

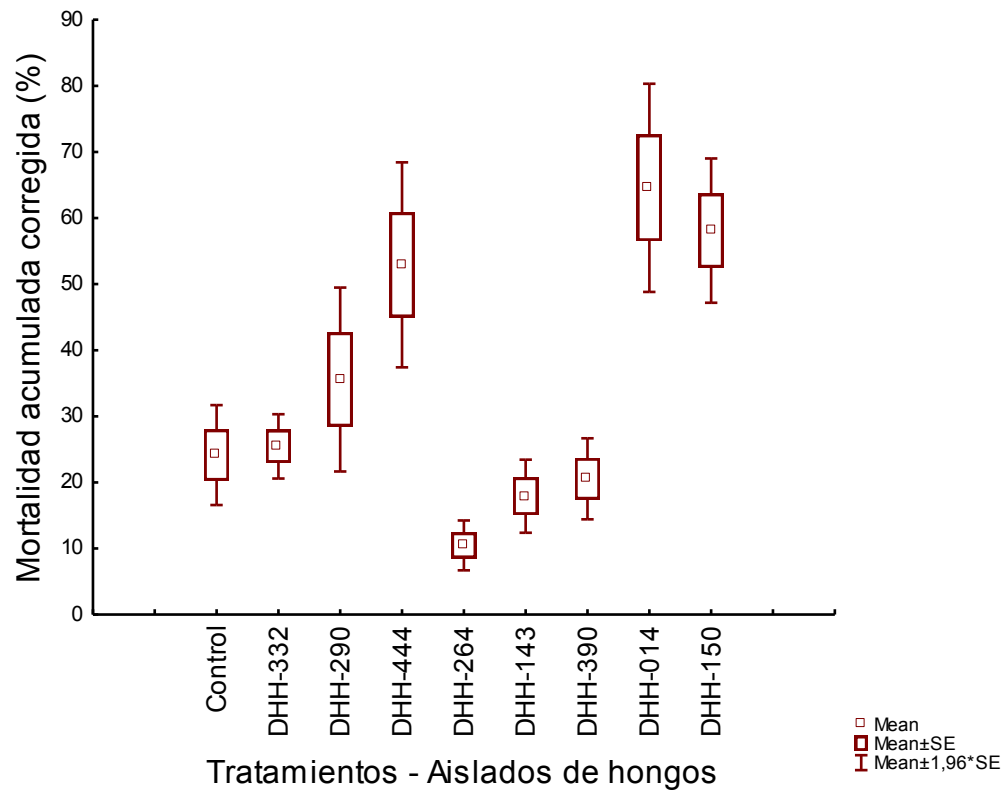


Los aislados compatibles con *A. flavus* (DHH-014), *Penicillium* sp. (DHH-150) y *A. ochraceus* (DHH-444), generaron los mayores porcentajes de mortalidad acumulada durante los 10 días de exposición permanente a los tratamientos. Las pruebas pareadas de rangos de Wilcoxon demostraron la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad acumulada corregida en todos los tratamientos (p <0,05), a excepción del

aislado DHH-332. Sin embargo, para el caso de los aislados DHH-143, DHH-264 y DHH-390, dichas diferencias se deben a que la ingestión de estos microorganismos, por parte de las obreras, aumentó su supervivencia con porcentajes de mortalidad acumulada por debajo de las registradas en los controles.

Por otra parte, en los ensayos por el método de contacto para la primera repetición en el tiempo, el análisis de varianza de medidas repetidas de Friedman evidenció que existen diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad acumulada corregida entre los tratamientos ($p= 0,00000$). De igual forma, las pruebas de rangos de Wilcoxon demostraron que, excepto para el aislado DHH-332, los tratamientos difieren significativamente del control ($p <0,05$). En concordancia con los resultados para los ensayos por ingestión, cuando las obreras estuvieron en contacto con las soluciones de conidios de los aislados DHH-143, DHH-264 y DHH-390, su supervivencia aumentó en comparación con el control y, en consecuencia, se registraron para estos tratamientos, los menores valores de mortalidad acumulada corregida (figura 9).

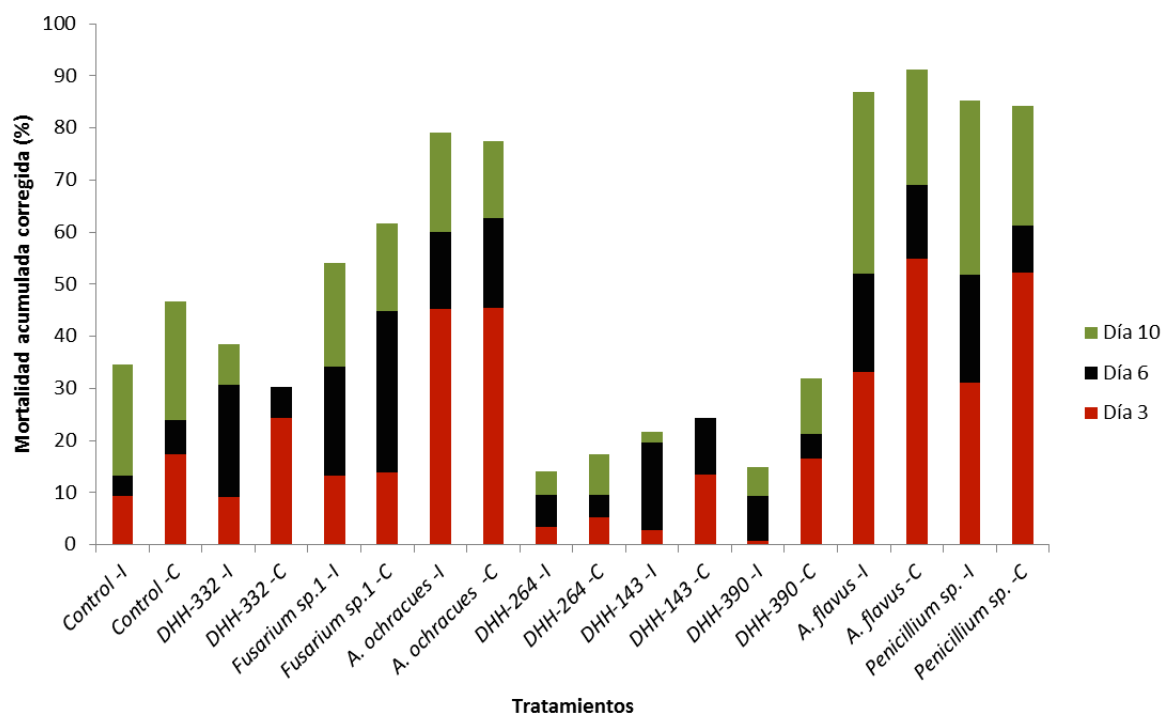
Figura 9. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de hongos (primera repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman (N= 10, df= 8) = 67,97 p=0,00000.



La aplicación de los hongos por el método de contacto y de ingestión, generaron resultados comparables en cuanto que los aislados afectaron negativamente la supervivencia de las obreras. Sin embargo, los valores promedio de porcentaje de mortalidad acumulada diaria fueron superiores cuando estos microorganismos fueron aplicados por contacto. En ambos casos, *A. flavus* (DHH-014) fue el hongo que produjo la mayor mortalidad acumulada, alcanzando, al décimo día, un promedio de 86,93% cuando se suministró en la dieta y de 91,15% en el tratamiento por contacto. Este fue seguido por *Penicillium* sp. (DHH-150) con

porcentajes de mortalidad acumulada de 85,32% y 84,15% por ingestión y contacto, respectivamente. Por su parte, *A. ochraceus* (DHH-444) en el mismo periodo generó una mortalidad acumulada de 79,11% por ingestión y de 77,55% por contacto. Por último, el aislado DHH-290, compatible con *Fusarium* sp.1, aunque tuvo un efecto negativo sobre la supervivencia de las obreras, fue menor en comparación con los otros aislados. Al décimo día, este hongo alcanzó porcentajes de mortalidad acumulada de 54,14% al suministrarlo en la dieta y de 61,66% cuando se colocaron las obreras en contacto con la solución de conidios. En la Fig. 10 se muestra que cuatro (*i.e.* *A. flavus*, *Penicillium* sp., *A. ochraceus*, *Fusarium* sp.) de los aislados de hongos procedentes de desechos de *A. cephalotes*, tienen un alto potencial insecticida mientras que DHH-143, DHH-264 y DHH-390, por el contrario, afectan positivamente la supervivencia de las obreras, presentándose en estos casos una menor mortalidad acumulada en relación con el control.

Figura 10. Mortalidad acumulada corregida promedio para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos en el día tres, seis y 10 del experimento (primera repetición en el tiempo).

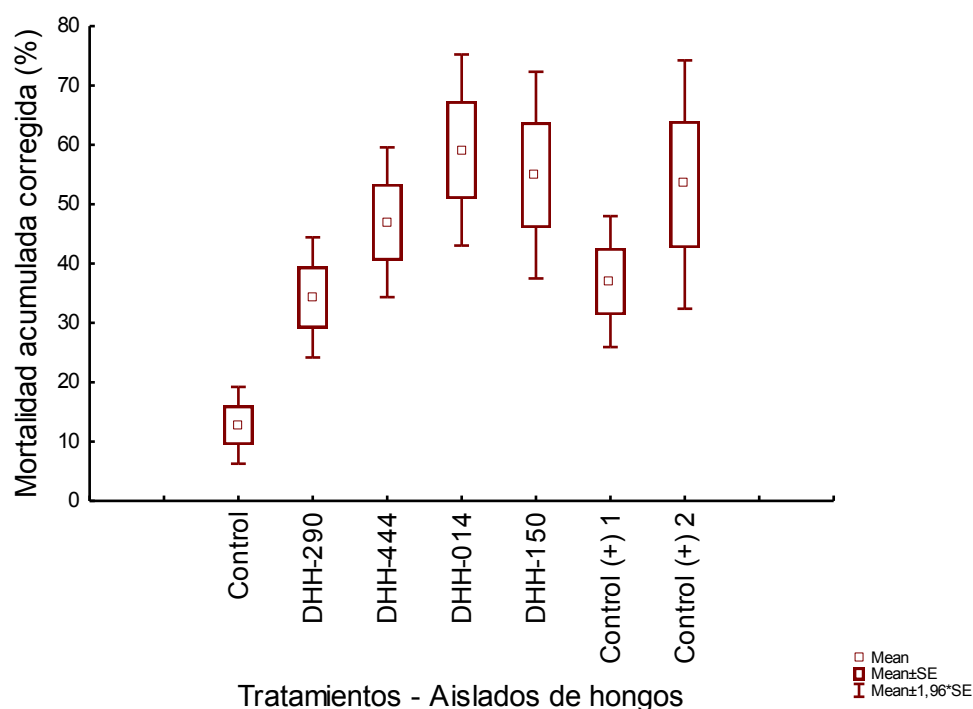


Para la segunda repetición, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera evaluación, se utilizaron solamente aquellos aislados que demostraron tener un potencial insecticida sobre obreras de *A. cephalotes* y, de esta manera, confirmar su actividad patógena sobre las obreras. Se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad acumulada corregida entre los tratamientos suministrados en la dieta (ANOVA $\chi^2_{(N=10, df=6)} = 44,25$ $p=0,00000$).

Se estableció que todos los tratamientos difirieron del control, presentando en todos los casos, valores de mortalidad acumulada significativamente superiores (pruebas de rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$). Además, cuando se compararon los porcentajes de mortalidad

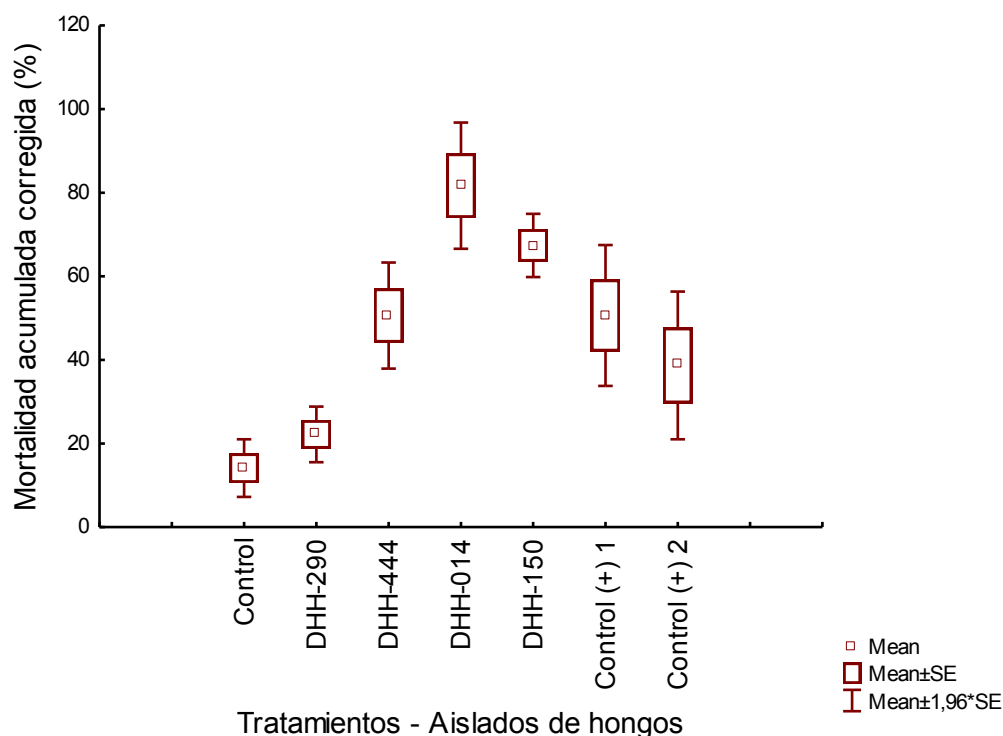
acumulada entre cada aislado procedente de los desechos de colonias de *A. cephalotes* con la cepa BIO-0312 de *Beauveria bassiana* (control positivo 1), se encontraron diferencias con *A. flavus* (DHH-014), *Penicillium* sp. (DHH-150) y *A. ochraceus* (DHH-444) ($p < 0,05$). Para *Fusarium* sp.1 no se evidenciaron diferencias significativas en comparación con el tratamiento con *B. bassiana* ($p = 0,16880$). Al comparar estos mismos aislados con la cepa BIO-0212 de *Metarhizium anisopliae* (control positivo 2), no se presentaron diferencias significativas entre éste y *A. flavus*, *Penicillium* sp. y *A. ochraceus* ($p > 0,05$), mientras que con *Fusarium* sp.1 se encontraron diferencias ($p = 0,012516$). Igualmente, al comparar los tratamientos por ingestión con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se registraron diferencias significativas ($p = 0,021825$) (figura 11).

Figura 11. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de hongos (segunda repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman ($N = 10$, $df = 6$) = 44,25403 $p = ,00000$.



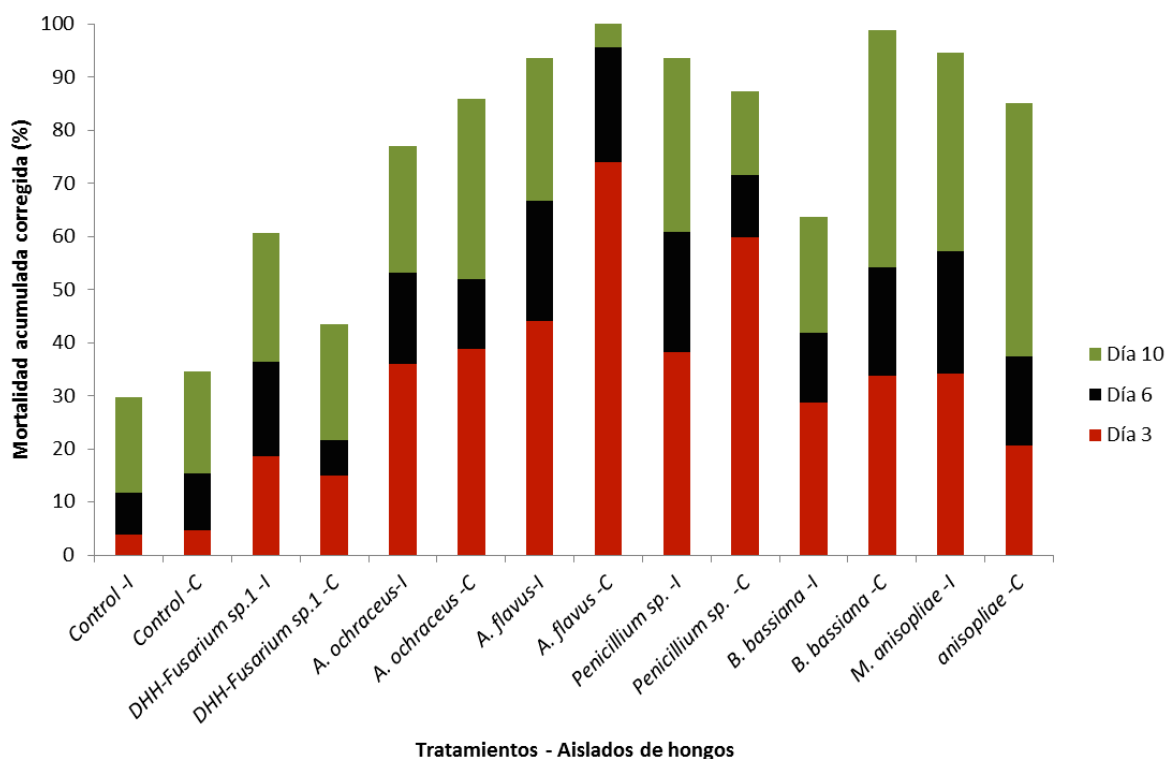
De otro lado, para la segunda evaluación mediante contacto, la prueba de Friedman arrojó diferencias significativas en la mortalidad corregida acumulada entre tratamientos ($p=0,00000$). Al compararse con el control, todos los tratamientos presentaron diferencias respecto a éste último ($p<0,05$). Sin embargo, al comparar los tratamientos con el control positivo 1 (*B. bassiana*), se encontraron diferencias entre éste y *A. falvus*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. ($p<0,05$), pero no con *A. ochraceus* ($p=0,152894$). En cuanto al control positivo 2 (*M. anisopliae*), todos los aislados de desechos mostraron diferencias en la mortalidad acumulada. Así mismo, fue diferente el efecto sobre la supervivencia debido al contacto con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (figura 12).

Figura 12. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de hongos (segunda repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman ($N=10$, $df=6$) = 54,51 $p=0,00000$.



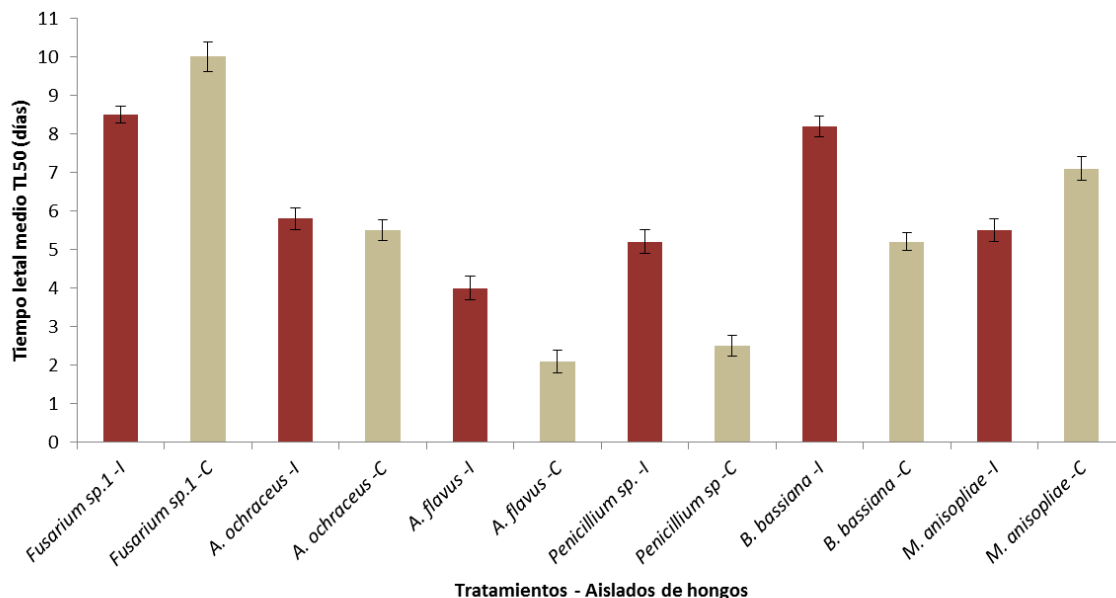
En esta segunda repetición, los datos mostraron consistencia con lo obtenido previamente, encontrando que *A. flavus*, *Penicillium* sp. y *A. ochraceus* fueron, en este orden, los que mejores resultados arrojaron para ambos métodos de aplicación. Es interesante, que tanto en los tratamientos por ingestión como por contacto, los aislados *A. flavus* en primer lugar y seguidamente, *Penicillium* sp., tuvieron los mayores valores de mortalidad acumulada durante todos los días de evaluación, incluso por encima de *B. bassiana* y de *M. anisopliae*, dos cepas utilizadas comercialmente para el control biológico de hormiga arriera en Colombia. Igualmente es de resaltar que se observó una diferencia en la actividad entre estas dos cepas de acuerdo con el método de aplicación, siendo mejor el efecto causado por *B. bassiana* sobre la supervivencia de las hormigas, al aplicar este hongo por contacto en comparación con el efecto causado por *M. anisopliae*. Por el contrario, éste último mostró un mejor efecto cuando fue suministrado en la dieta (figura 13).

Figura 13. Mortalidad acumulada corregida promedio para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos en el día tres, seis y 10 del experimento (segunda repetición en el tiempo). Control (+) 1: *B. bassiana*. Control (+) 2: *M. anisopliae*.



En términos del tiempo letal medio (TL_{50}), la efectividad para producir la muerte de las obreras en el menor tiempo, demostró ser mejor, en primer lugar *A. flavus*, seguido de *Penicillium* sp. y *A. ochraceus*. En el tratamiento por contacto, el TL_{50} promedio fue mucho menor en *A. flavus* con 2,1 días y *Penicillium* sp. con 2,5 días en comparación con los otros hongos evaluados, así como en comparación con el tratamiento por ingestión. Estos valores, están muy por debajo de los registrados para *B. bassiana* (5,2 días) y *M. anisopliae* (7,1 días). El aislado de *Fusarium* sp.1 por el contrario, presentó los mayores valores promedio de TL_{50} (tabla 3, figura 14).

Figura 14. Promedio del tiempo letal medio TL50 en los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de hongos. Control (+) 1: *B. bassiana* Control (+) 2: *M. anisopliae*. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



En relación con el porcentaje promedio de colonización, en general se encontró una correlación positiva entre esta variable y el porcentaje de mortalidad acumulada, siendo mayor en todos los casos, para los tratamientos aplicados por contacto. Para el control positivo 2 (*M. anisopliae*), se observaron valores bajos de porcentaje de colonización en comparación con los demás tratamientos, mostrando incluso poca correlación entre esta variable y la mortalidad acumulada cuando se suministró a las obreras como parte de la dieta (tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio de las variables evaluadas para los aislamientos nativos de hongos en los tratamientos por ingestión y contacto.

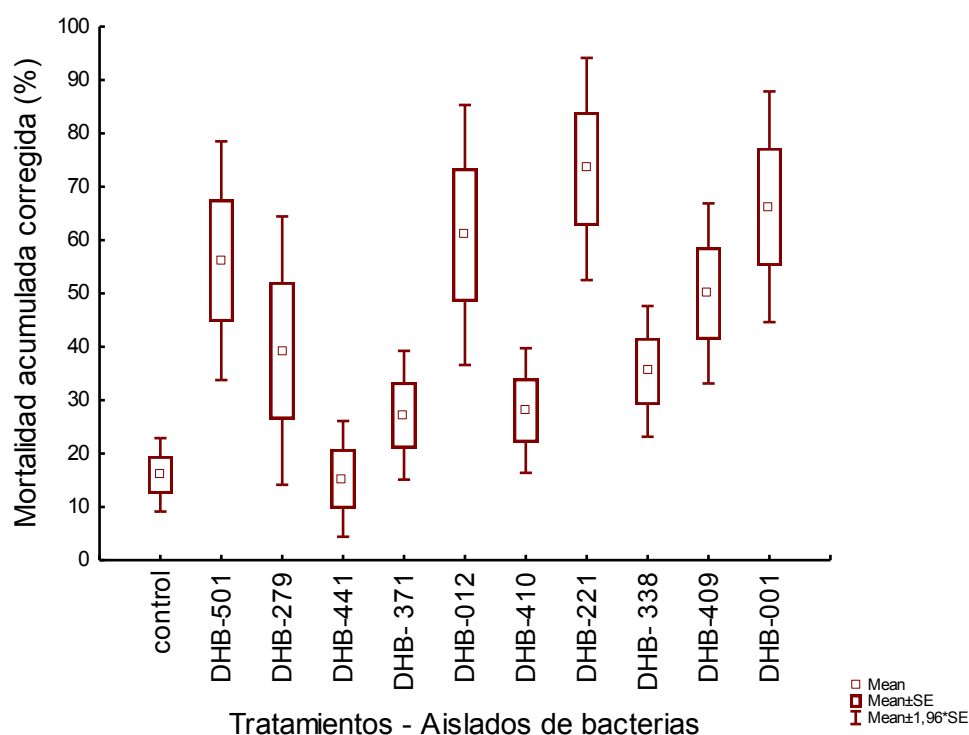
Aislado	Tratamiento por ingestión			Tratamiento por contacto		
	Mortalidad acumulada corregida día 10	TL ₅₀ (días)	Colonización (%)	Mortalidad acumulada corregida día 10	TL ₅₀ (días)	Colonización (%)
<i>Fusarium</i> sp. (DHH-290)	60,71	8,5	58,29	43,48	10	63,33
<i>A. ochraceus</i> (DHH-444)	76,94	5,8	70,04	85,84	5,5	83,29
<i>A. flavus</i> (DHH-014)	93,64	4	76,07	100	2,1	84,06
<i>Penicillium</i> sp. (DHH-150)	93,47	5,2	67,34	87,24	2,5	72,33
<i>B. bassiana</i> (control + 1)	63,69	8,2	59,05	98,73	5,2	77,33
<i>M. anisopliae</i> (control + 2)	94,57	5,5	54,69	85,1	7,1	69,84

5.4.2 Evaluación del potencial insecticida de los aislados de bacterias

De igual forma que se procedió en los ensayos con los aislados de hongos, se realizaron dos evaluaciones independientes en el tiempo. El análisis estadístico de los datos obtenidos en la primera repetición, demuestra la existencia de diferencias significativas en los valores promedio de la mortalidad acumulada corregida entre los tratamientos por ingestión (ANOVA χ^2 (N= 10, df= 10) = 82,58 p= 0,00000). A través de las pruebas por rangos de

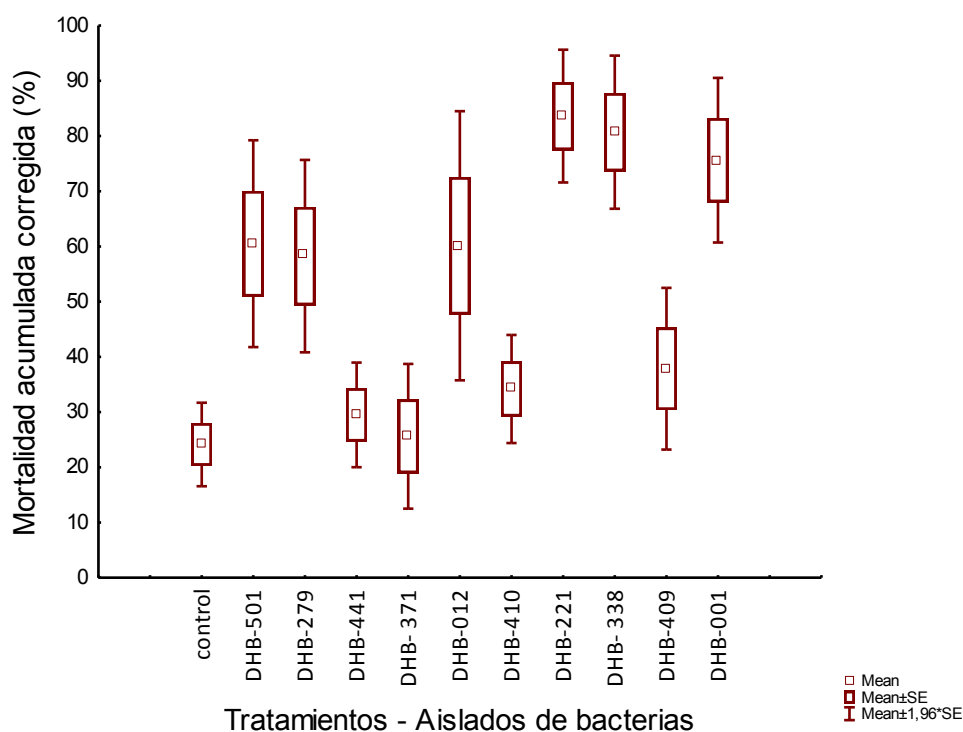
Wilcoxon, se encontraron diferencias significativas en la mortalidad acumulada en comparación con el control, para los tratamientos por ingestión con los aislados compatibles con *Enterobacter* sp., (DHB-501), *Bacillus* sp.1 (DHB-279), *Bacillus subtilis* (DHB-012), *Serratia liquefasciens* (DHB-221), DHB-338 (aislado sin determinar), *Bacillus* sp.2 (DHB-409) y *S. marcescens* (DHB-001) ($p < 0,05$). Por el contrario, no hubo diferencias para los aislados DHB-441, DHB-371 y DHB-410 ($p > 0,05$) (figura 15).

Figura 15. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de bacterias (primera repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman ($N = 10$, $df = 10$) = 82,58 $p = 0,00000$.



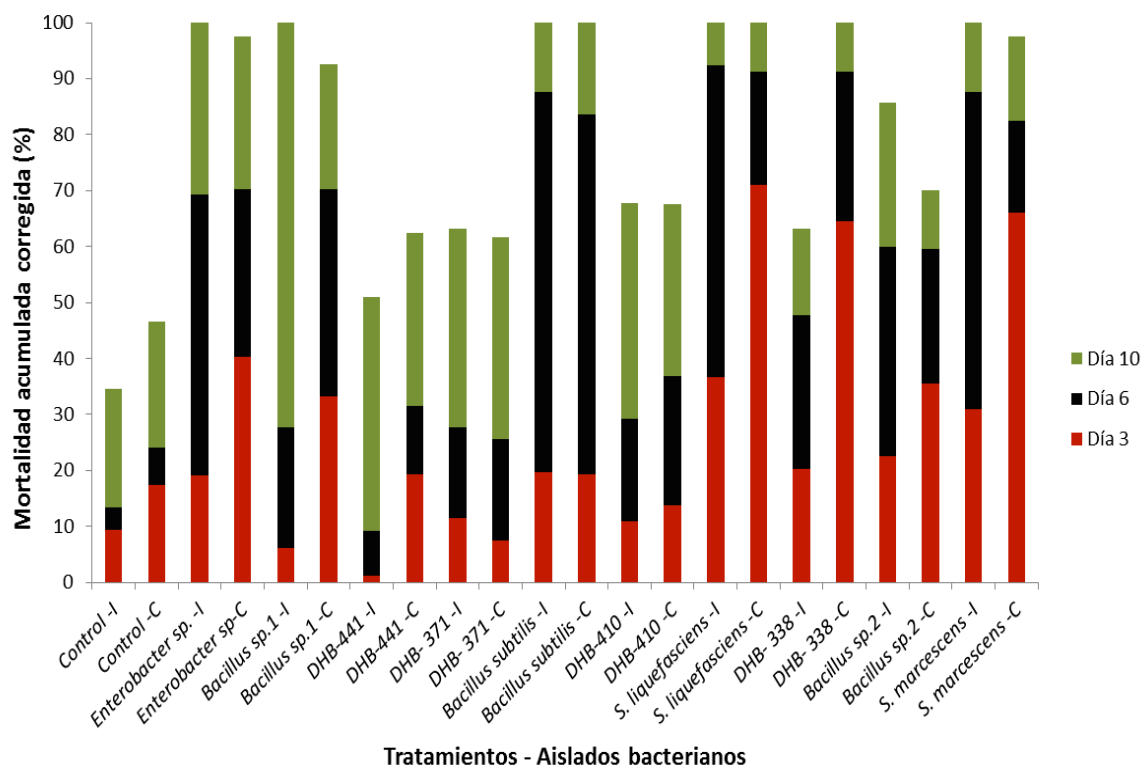
Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos cuando las bacterias fueron aplicadas por contacto (ANOVA de Friedman $p= 0,00000$). Las comparaciones por pares de cada tratamiento con el control, demostraron que de igual forma, se encontraron diferencias con los aislados de *Enterobacter* sp. (DHB-501), *Bacillus* sp.1 (DHB-279), *Bacillus subtilis* (DHB-012), *S. liquefasciens* (DHB-221), DHB-338, *Bacillus* sp.2 (DHB-409) y *S. marcescens* (DHB-001) ($p < 0,05$; pruebas por rangos de Wilcoxon) (figura 16).

Figura 16. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de bacterias (primera repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman ($N= 10$, $df= 10$) = 86,08 $p= 0,00000$.



Al igual que ocurrió en las evaluaciones con los aislados de hongos, cuando se compararon ambos métodos de aplicación de los microorganismos, se generaron resultados consistentes en relación con los aislados bacterianos que demostraron tener un efecto negativo sobre las obreras. No obstante, merece la pena resaltar que, en general, al décimo día de tratamiento se observaron valores de mortalidad acumulada ligeramente superiores cuando las bacterias fueron ingeridas por las hormigas. Al décimo día de exposición a los tratamientos, a excepción del aislado *Bacillus* sp.1 (DHB-409), que registró valores de 85,71% y 74,48% por ingestión y contacto, respectivamente, y DHB-338 que alcanzó un 63,27% por contacto. En los demás casos, se alcanzaron porcentajes de mortalidad de 100% o muy cercanos a él (figura 17).

Figura 17. Mortalidad acumulada corregida promedio para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias en el día tres, seis y 10 del experimento (primera repetición en el tiempo).



En la segunda evaluación en el tiempo, se dieron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad acumulada corregida entre los tratamientos suministrados en la dieta (ANOVA $\chi^2_{(N=10, df=8)}=75,18$ $p=0,00000$) y por contacto (ANOVA $\chi^2_{(N=10, df=7)}=60,93$ $p=0,00000$). Así mismo, para ambos métodos, las pruebas por rangos de Wilcoxon, demostraron que todos los tratamientos presentaron diferencias respecto al control, con valores de mortalidad acumulada por encima de las registradas en éste último ($p < 0,05$) (figuras 18 y 19).

Figura 18. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por ingestión con los aislados de bacterias (segunda repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman ($N=10$, $df=8$) = 75,18 $p=0,00000$.

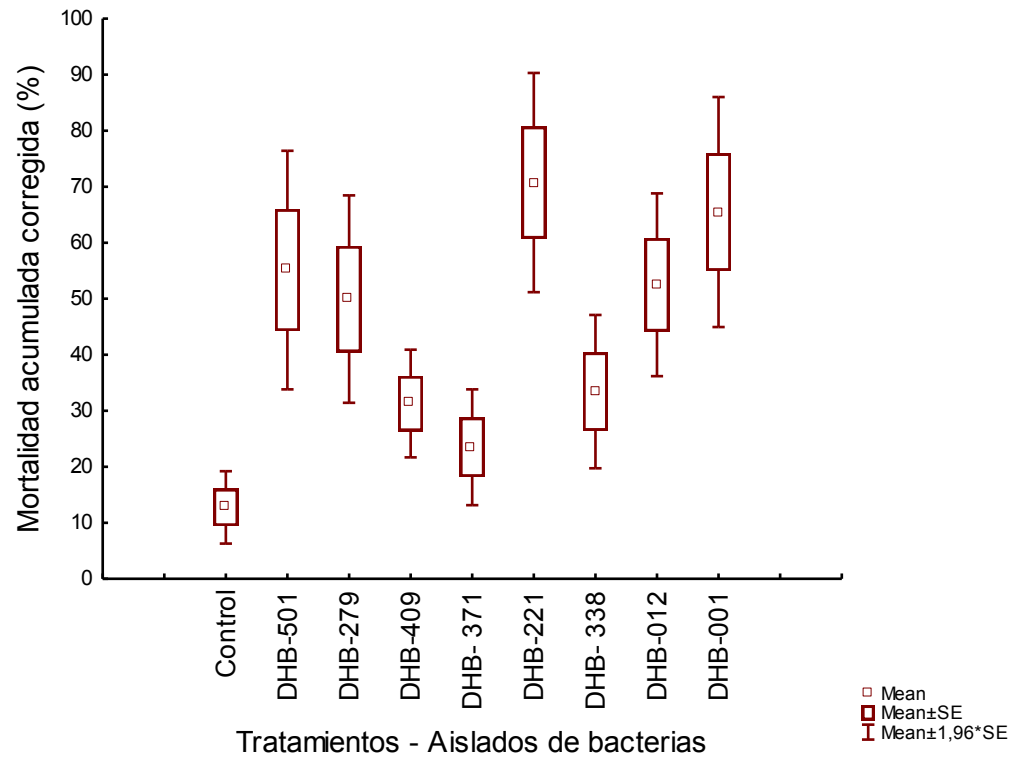
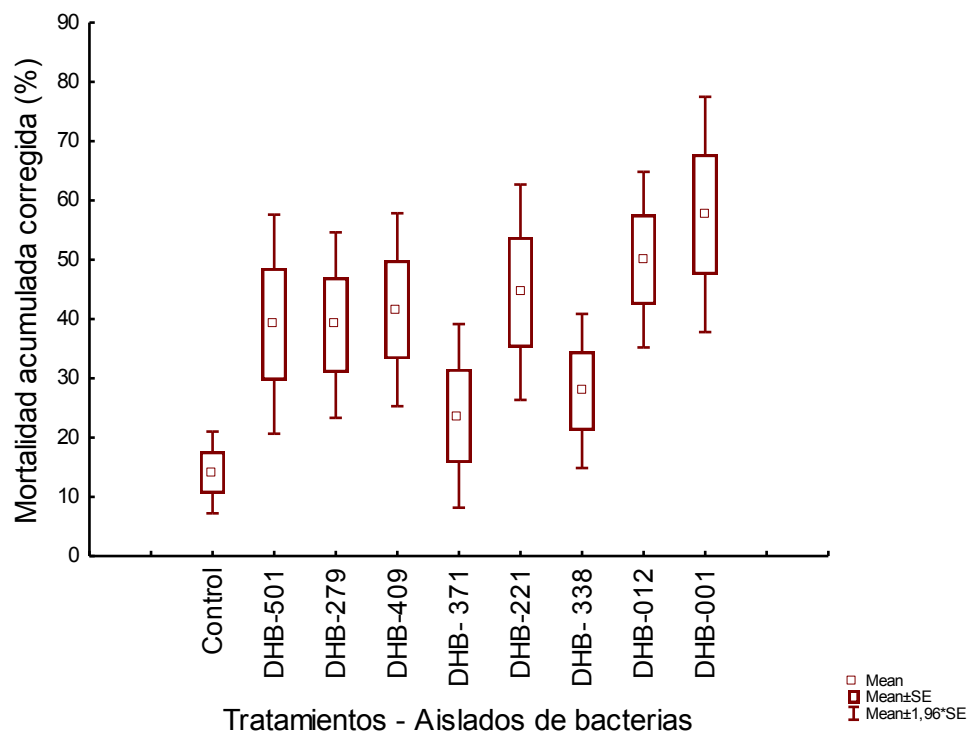
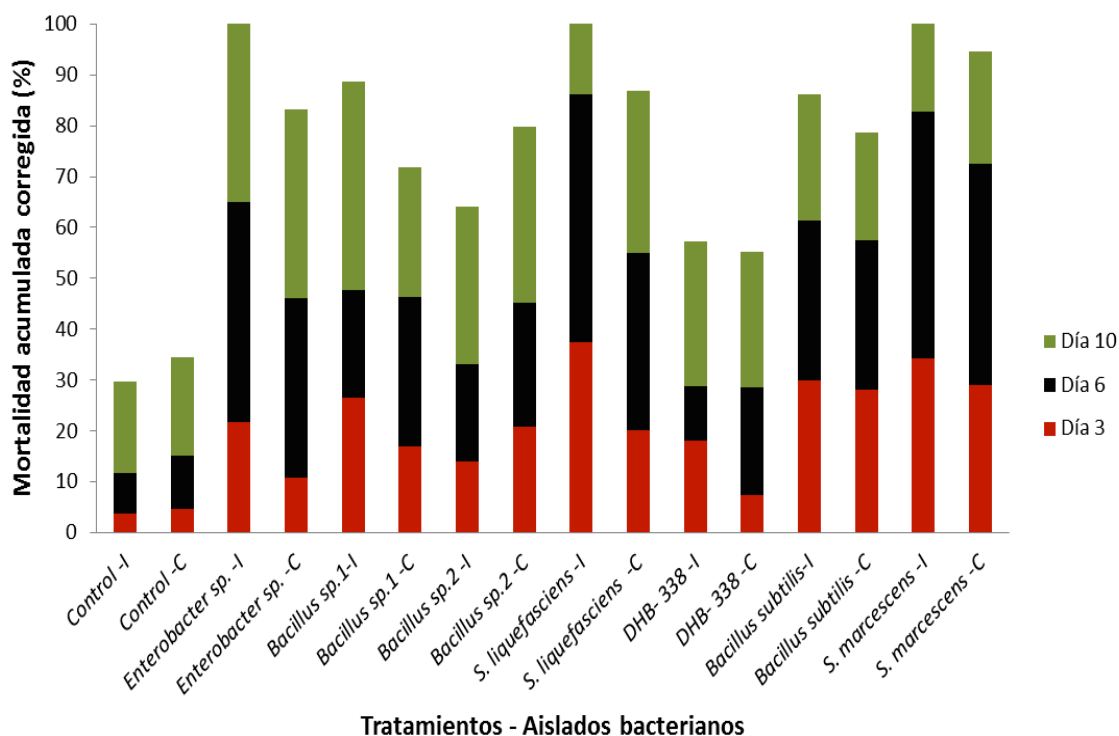


Figura 19. Promedio de mortalidad acumulada corregida para los tratamientos por contacto con los aislados de bacterias (segunda repetición en el tiempo). Los límites de las cajas corresponden al error estándar y las barras muestran los valores mínimo y máximo en cada tratamiento. ANOVA de Friedman (N= 10, df= 7) = 60,93 p= 0,00000.



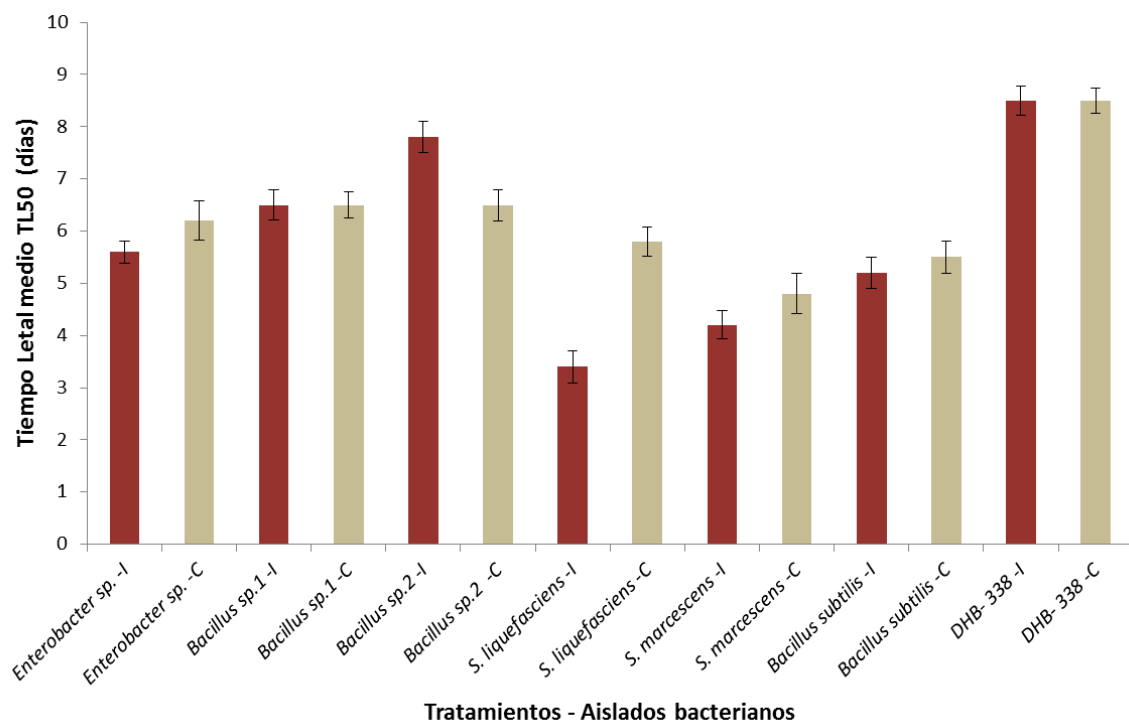
En concordancia con lo observado en las primeras pruebas, se encontró que los mayores valores de mortalidad al final de los experimentos, se presentaron cuando las obreras consumieron directamente las bacterias presentes en la dieta, registrando para *Enterobacter* sp., *S. liquefasciens* y *S. marcescens*, porcentajes de mortalidad del 100%. Sin embargo, los otros aislados tuvieron porcentajes relativamente altos (88,65% para *Bacillus* sp.1 y 86,22% para *Bacillus subtilis*). DHB-338, aislado sin determinar, tuvo menores porcentajes de mortalidad tanto en el tratamiento por ingestión como por contacto (figura 20).

Figura 20. Mortalidad acumulada corregida promedio para los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias en el día tres, seis y 10 del experimento (segunda repetición en el tiempo).



Respecto al tiempo letal medio, se encontró una correlación ($r^2 = 0,92$) con la mortalidad acumulada, observando los menores valores de TL_{50} en aquellos tratamientos que alcanzaron una mortalidad del 100% o cercana a ella. En las evaluaciones por ingestión, *S. liquefasciens* produjo la muerte del 50% de la población en un tiempo promedio de 3,4 días, seguido de *S. marcescens* y *Bacillus subtilis* con 4,2 y 5,6 días, respectivamente. El aislado DHB-338 tuvo el mayor valor de TL_{50} (8,5 días). De otro lado, en las pruebas por contacto, *S. marcescens* presentó un TL_{50} promedio de 4,8 días y seguida de *Bacillus subtilis* con 5,5 y *S. liquefasciens* con 5,8 días. De igual manera, DHB-338 presentó el mayor TL_{50} , (figura 21, tabla 4).

Figura 21. Promedio del tiempo letal medio TL_{50} en los tratamientos por ingestión (I) y contacto (C) con los aislados de bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Los porcentajes promedio de colonización fueron mayores para los aislados Gram negativos (*S. marcescens*, *S. liquefasciens* y *Enterobacter* sp.) cuando fueron ingeridos que por contacto. Por el contrario, los aislados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp.1 y *Bacillus* sp.2 tuvieron mayores porcentajes de colonización en la aplicación por contacto (tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio de las variables evaluadas para los aislamientos nativos de hongos en los tratamientos por ingestión y contacto.

Aislado	Tratamiento por ingestión			Tratamiento por contacto		
	Mortalidad acumulada corregida día 10	TL ₅₀ (días)	Colonización (%)	Mortalidad acumulada corregida día 10	TL ₅₀ (días)	Colonización (%)
<i>Enterobacter</i> sp. (DHB-501)	100	5,6	56,22	83,13	6,2	48,66
<i>Bacillus</i> sp.1 (DHB-279)	88,65	6,5	41,67	71,81	6,5	51,67
<i>Bacillus</i> sp.2 (DHB-409)	64,02	7,8	26,73	79,87	6,5	31,82
<i>S. liquefasciens</i> (DHB-221)	100	3,4	60,28	86,91	5,8	38,77
<i>Bacillus subtilis</i> (DHB-012)	86,22	5,2	36,51	78,54	5,5	42,28
DHB- 338	57,21	8,5	32,14	55,26	8,5	27,13

5.5 PRUEBAS DE COEXISTENCIA ENTRE LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL ANTAGÓNICO Y/O INSECTICIDA

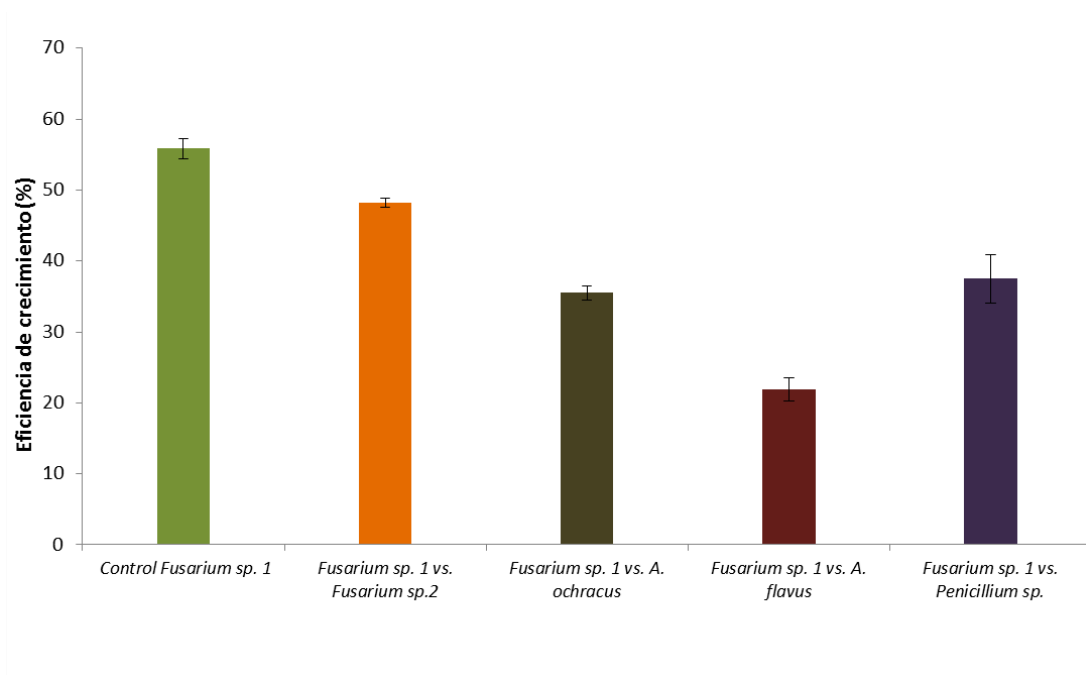
5.5.1 Coexistencia entre hongos

En las pruebas para determinar la capacidad de interacción entre los hongos que tuvieron un efecto negativo sobre los microorganismos simbiotes y/o sobre las obreras, se presentaron

dificultades para registrar los datos cuantitativos de eficiencia de crecimiento. Cuando se enfrentaron cada uno de los hongos con *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp., debido a sus características de crecimiento invasivo, se observó que el micelio de estos dos hongos creció sobre los otros microorganismos con los que se enfrentaron, por lo que no fue posible determinar su posible efecto sobre la disminución de crecimiento. En consecuencia, se excluyeron estos dos hongos de los análisis posteriores.

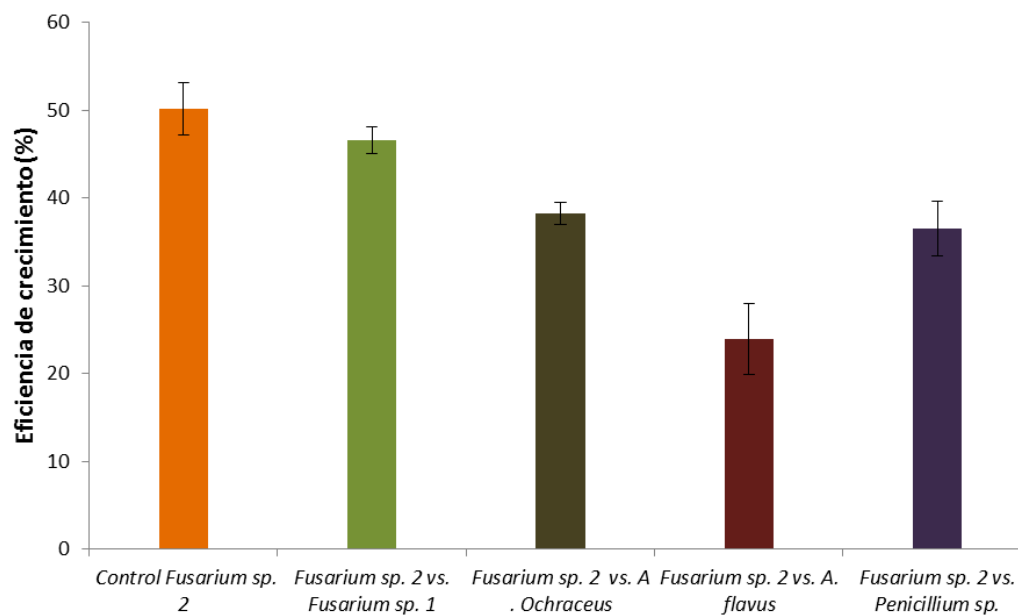
En el caso de *Fusarium* sp.1, los análisis estadísticos indican que su eficiencia de crecimiento es afectada negativamente en los enfrentamientos con *A. flavus*, *Penicillium* sp. y *A. ochraceus*. ($p < 0,05$; prueba U Mann-Whitney). No obstante, fue evidente que *A. flavus* fue el hongo que más afectó el crecimiento de *Fusarium* sp.1, mientras que se observó un efecto comparable entre *A. ochraceus* y *Penicillium* sp. Por su parte, no se encontraron diferencias en la eficiencia de crecimiento al enfrentar las dos cepas de *Fusarium* (*Fusarium* sp.1 y *Fusarium* sp.2) (figura 22).

Figura 22. Eficiencia de crecimiento promedio de *Fusarium* sp.1 en los enfrentamientos con cada uno de los hongos. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



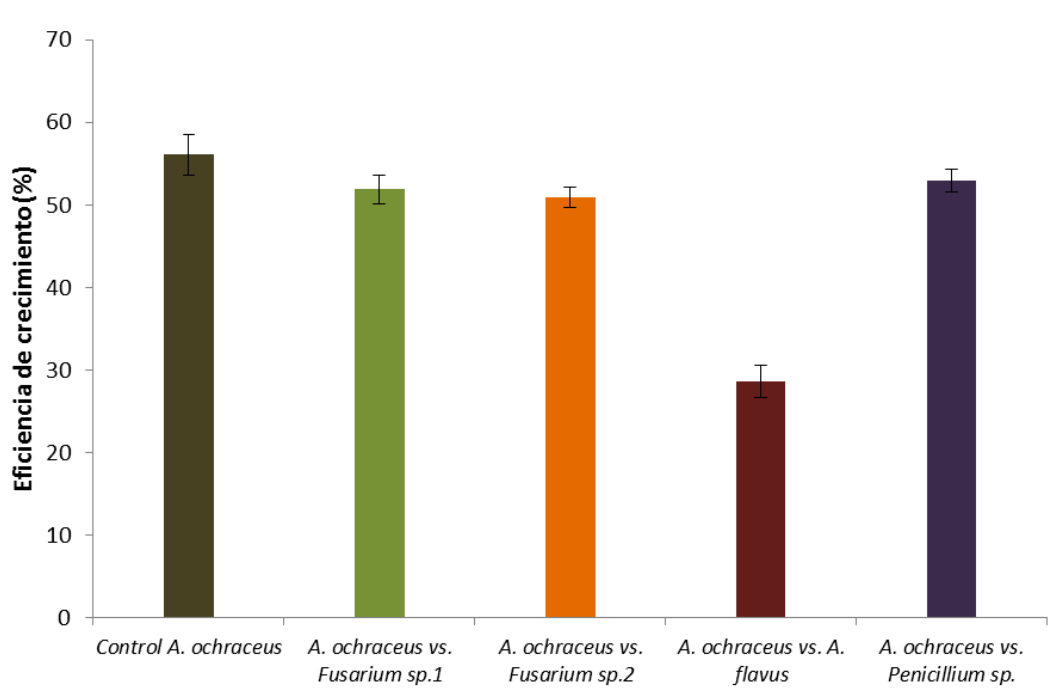
De manera similar, el aislado de *Fusarium* sp.2, tuvo una eficiencia de crecimiento diferente respecto al control, cuando creció conjuntamente con *A. flavus*, que fue el hongo que produjo un mayor efecto inhibitorio, seguido por *Pencillium* sp. y luego, con un efecto comparable al producido por éste último, *A. ochraceus*. ($p < 0,05$, prueba U Mann-Whitney). Igualmente, se corroboró la capacidad de coexistencia de *Fusarium* sp.1 y *Fusarium* sp.2, dado que no se encontraron diferencias significativas respecto al control ($p=0,08466$) (figura 23).

Figura 23. Eficiencia de crecimiento promedio de *Fusarium* sp.2 en los enfrentamientos con cada uno de los hongos. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Por otra parte, la eficiencia de crecimiento de *A. ochraceus* fue afectada negativamente en presencia de *A. flavus* ($p= 0,003948$), mientras que la coexistencia con los otros aislados de hongos no tuvo un efecto significativo sobre su crecimiento ($p > 0,05$) (figura 24).

Figura 24. Eficiencia de crecimiento promedio de *A. ochraceus* en los enfrentamientos con cada uno de los hongos. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Se evidenció la existencia de un efecto negativo por parte de *Penicillium* sp. ($p=0,006483$) en las evaluaciones de coexistencia para *A. flavus*, ($p> 0,05$; U Mann-Whitney) realizadas para comparar la eficiencia de crecimiento de este hongo en el control y los tratamientos de enfrentamiento. En contraste, no hubo diferencias para los demás tratamientos (figura 25).

Por último, el crecimiento de *Penicillium* sp. no fue afectado negativamente por ninguno de los hongos con potencial antagónico y/o entomopatógeno, demostrando su capacidad de coexistir con estos aislados ($p> 0,05$; prueba U Mann-Whitney) (figura 26).

Figura 25. Eficiencia de crecimiento promedio de *A. flavus* en los enfrentamientos con cada uno de los hongos. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

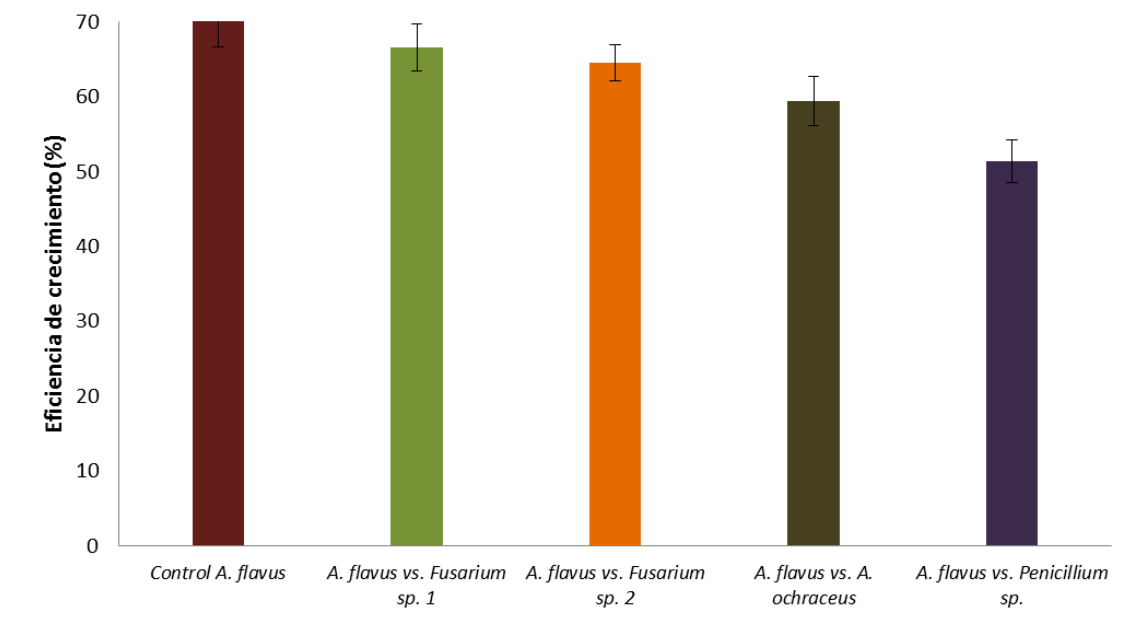
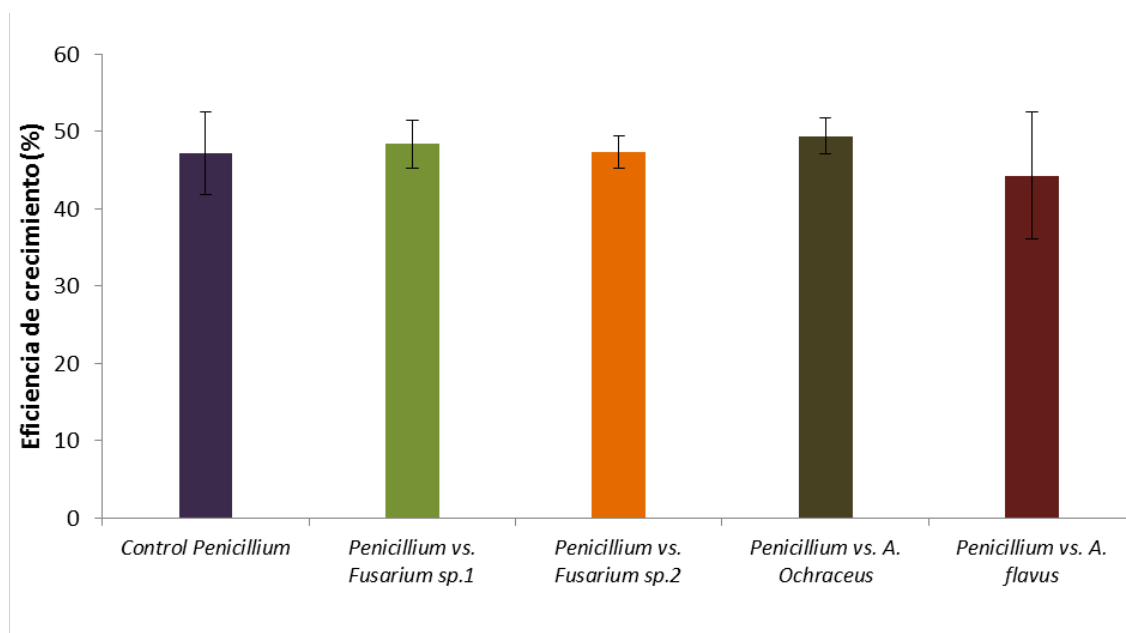


Figura 26. Eficiencia de crecimiento promedio de *Penicillium* sp. en los enfrentamientos con cada uno de los hongos. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%

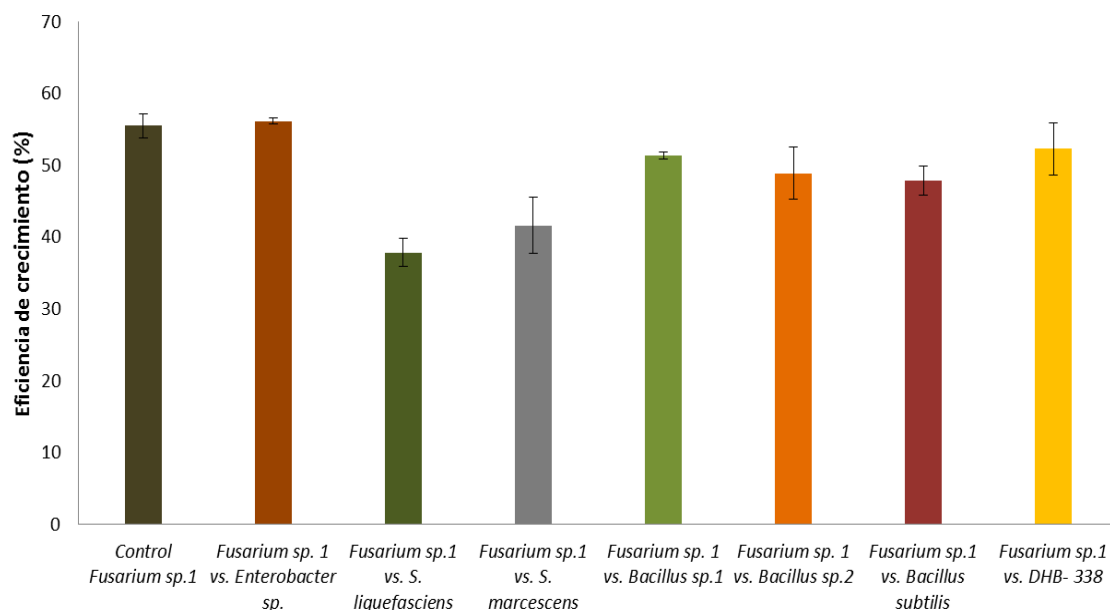


5.5.2 Coexistencia entre hongos y bacterias

En estos ensayos de enfrentamiento, en todos los casos las bacterias presentaron iguales características en su crecimiento en comparación con los controles, en donde la bacteria se encontró creciendo sola. Debido a que en estos casos no se pudo obtener un dato cuantitativo, la característica del crecimiento se tuvo como criterio para determinar el efecto de los hongos sobre las bacterias. Teniendo en cuenta esto, ninguno de los hongos con los que se enfrentaron los siete aislados de bacterias identificados previamente con potencial antagonico y/o patógeno, tuvo un efecto negativo sobre su crecimiento.

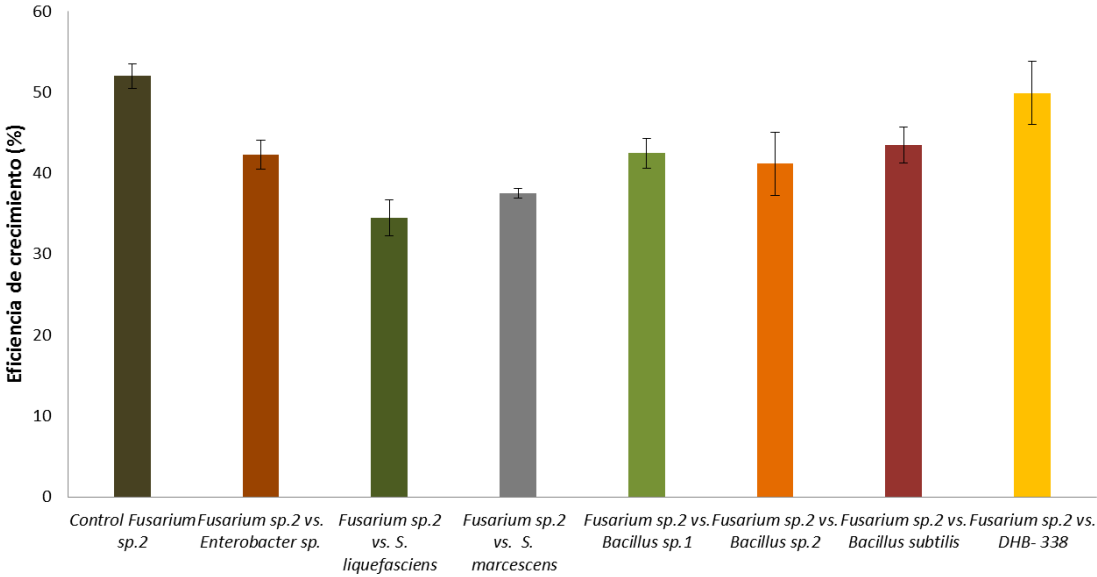
De otro lado, al comparar la eficiencia de crecimiento de cada uno de los hongos en los enfrentamientos con las bacterias, se evidenció que para *Fusarium* sp.1 se presentaron diferencias significativas en esta variable en comparación con el control, al estar en presencia de *S. liquefasciens* (DHB-221) y *S. marcescens* (DHB-001) ($p= 0,020922$ y $p= 0,043540$, respectivamente). Ninguno de los otros cinco aislados de bacterias tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de este hongo ($p> 0,05$) (figura 27).

Figura 27. Eficiencia de crecimiento promedio de *Fusarium* sp.1 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



La eficiencia de crecimiento de *Fusarium* sp.2, presentó diferencias respecto al control en presencia de *S. liquefasciens* (DHB-221), *S. marcescens* (DHB-001), *Bacillus* sp.1 (DHB-279), *Bacillus* sp.2 (DHB-409) y *Bacillus subtilis* (DHB-012). La única bacteria que no afectó su crecimiento fue el aislado DHB-338 ($p=0,6337$) (figura 28).

Figura 28. Eficiencia de crecimiento promedio de *Fusarium* sp.2 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Ninguna de las bacterias tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de los hongos *A. flavus*, *A. ochraceus* ni *Penicillium* sp. ($p > 0,05$). (figuras 29-31).

Figura 29. Eficiencia de crecimiento promedio de *A. flavus* en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

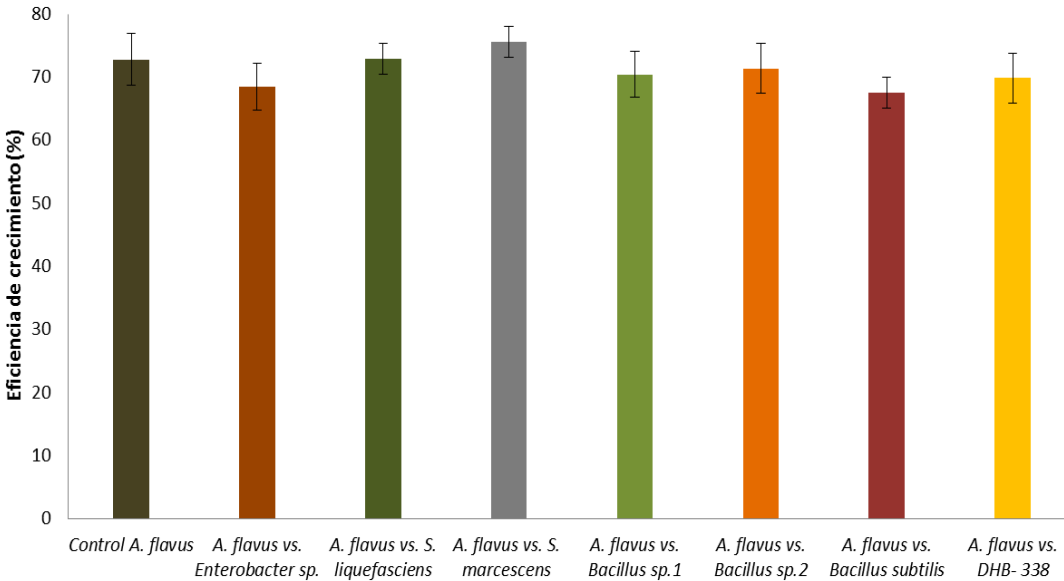


Figura 30. Eficiencia de crecimiento promedio de *A. ochraceus* en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

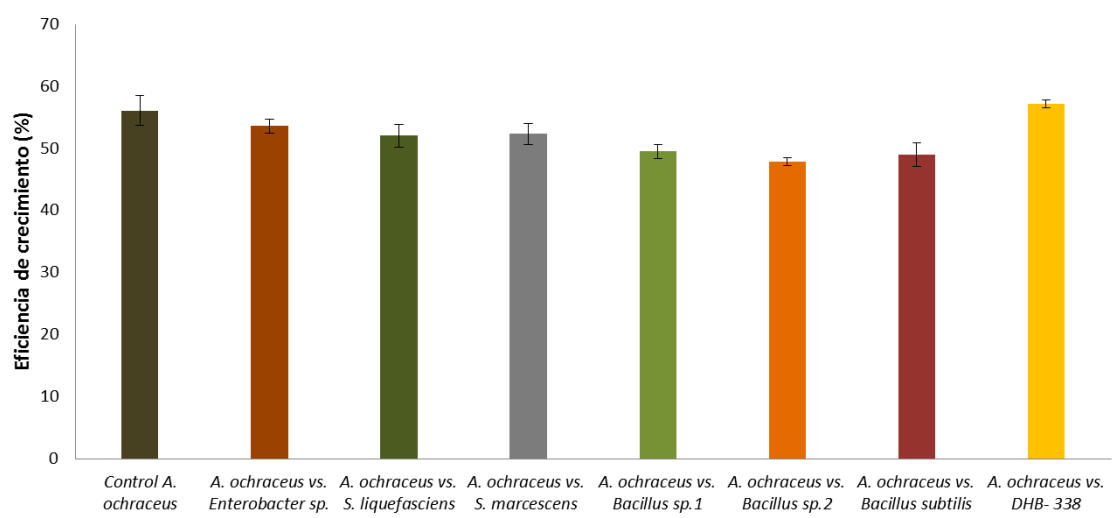
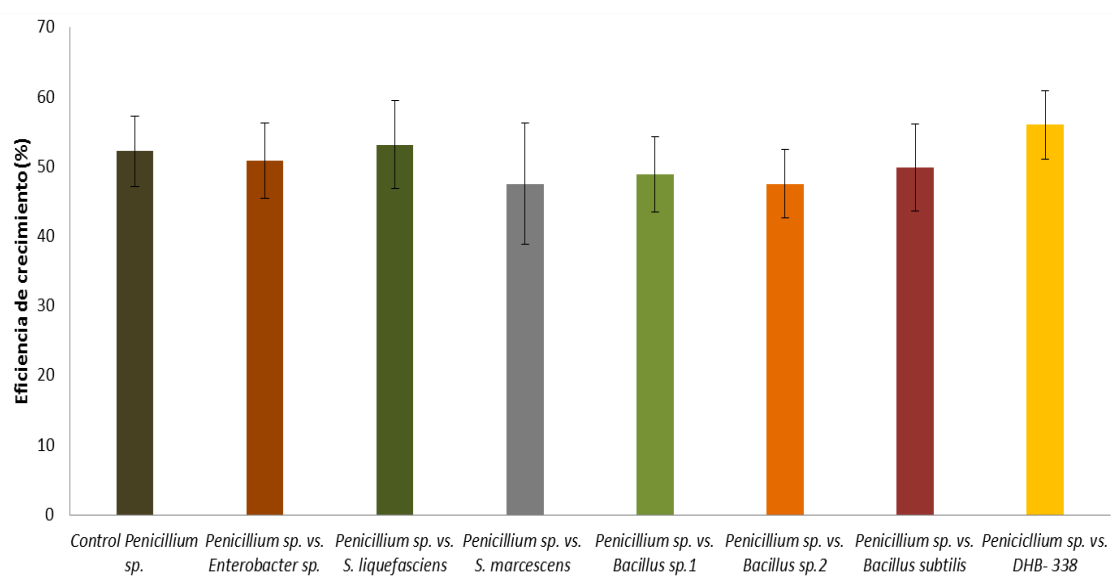


Figura 31. Eficiencia de crecimiento promedio de *Penicillium* sp. en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



5.5.3 Coexistencia entre bacterias

Las pruebas de comparación indicaron que la eficiencia de crecimiento de *Enterobacter* sp. se afectó negativamente en los enfrentamientos con *S. liquefaciens* (DHB-221), *S. marcescens* (DHB-001) y *Bacillus* sp.2 (DHB-409) ($p < 0,05$; U Mann-Whitney). Sin embargo, se observó que *S. marcescens* y *Bacillus* sp.2 con un efecto comparable, fueron las bacterias que en mayor medida afectaron el crecimiento de *Enterobacter* sp. De otro lado, no se encontraron diferencias al enfrentar esta bacteria con los demás aislados (figura 32). De forma similar, el crecimiento de *S. liquefaciens* fue afectado en presencia de *S. marcescens*, *Bacillus* sp.2 y *Enterobacter* sp. ($p < 0,05$), más no hubo un efecto en los otros enfrentamientos (figura 33).

Figura 32. Eficiencia de crecimiento promedio de *Enterobacter* sp. en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

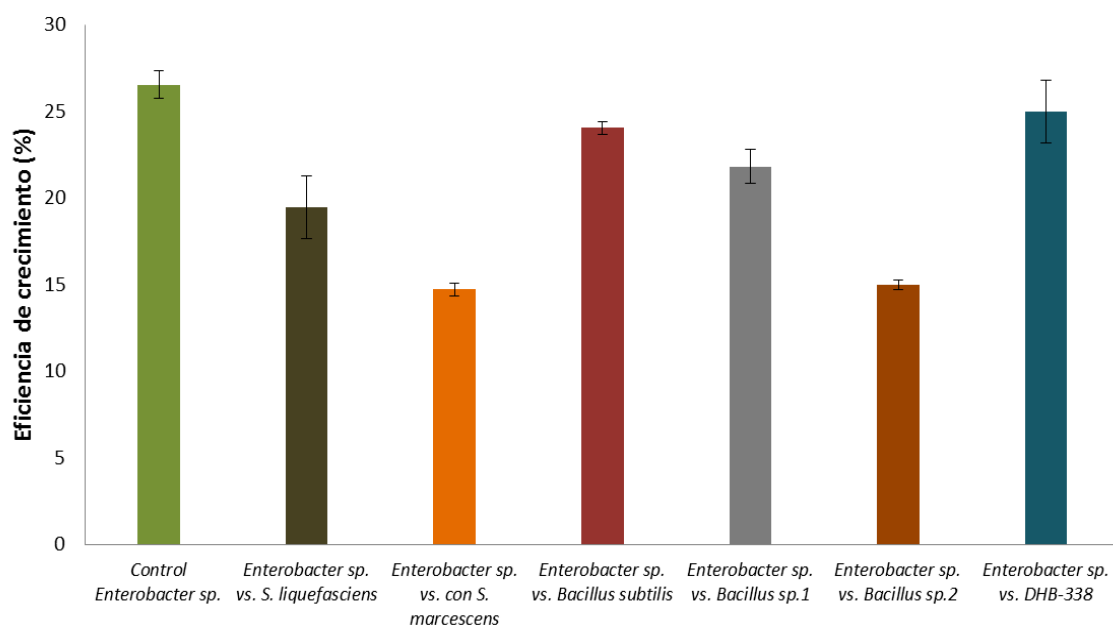
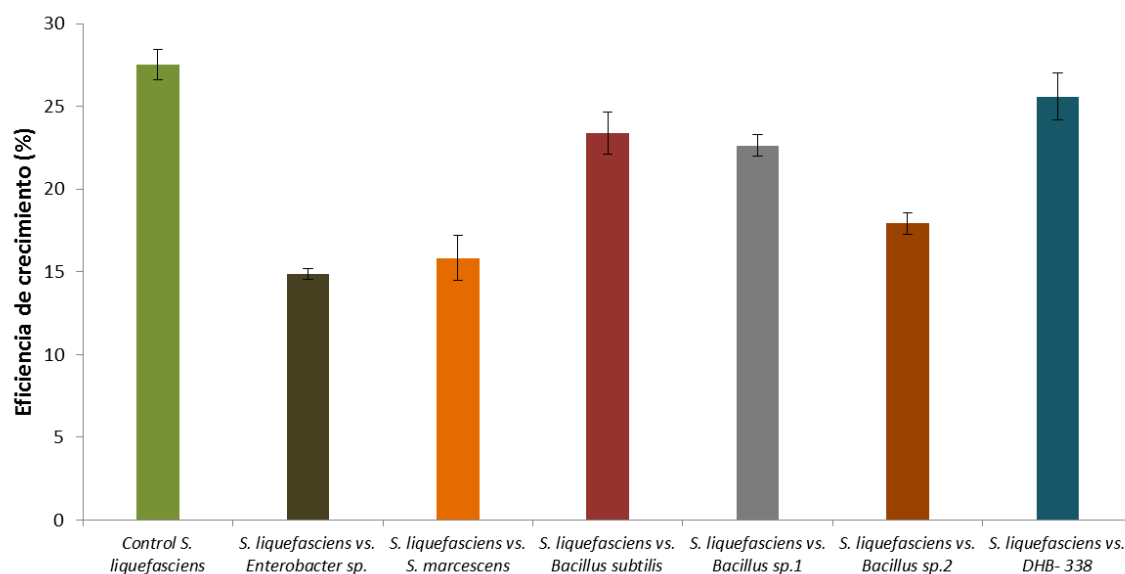
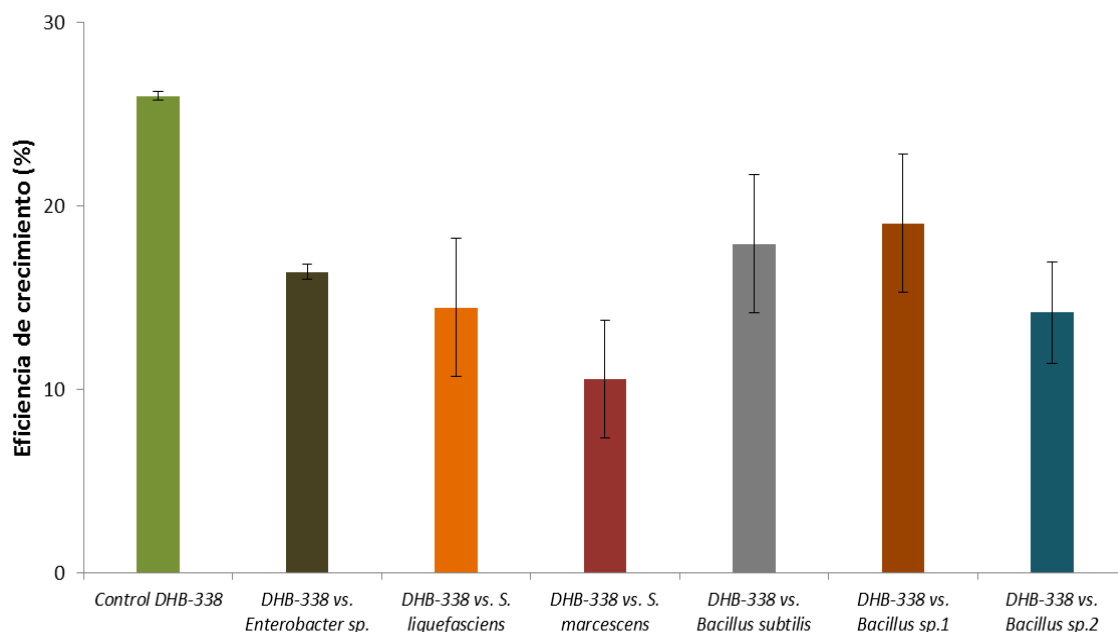


Figura 33. Eficiencia de crecimiento promedio de *S. liquefasciens* en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Por el contrario, el aislado DHB-338 tuvo una eficiencia de crecimiento significativamente diferente respecto al control, en los tratamientos con todas las bacterias evaluadas ($p < 0,05$) (figura 34).

Figura 34. Eficiencia de crecimiento promedio del aislado DHB-338 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



Por último, en las evaluaciones de coexistencia para *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp.1 y *Bacillus* sp.2, las pruebas estadísticas indicaron que no existe un efecto negativo el crecimiento por parte de ninguna de las bacterias con que se enfrentaron ($p > 0,05$) (figuras 35-37).

Figura 35. Eficiencia de crecimiento promedio de *Bacillus subtilis* en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

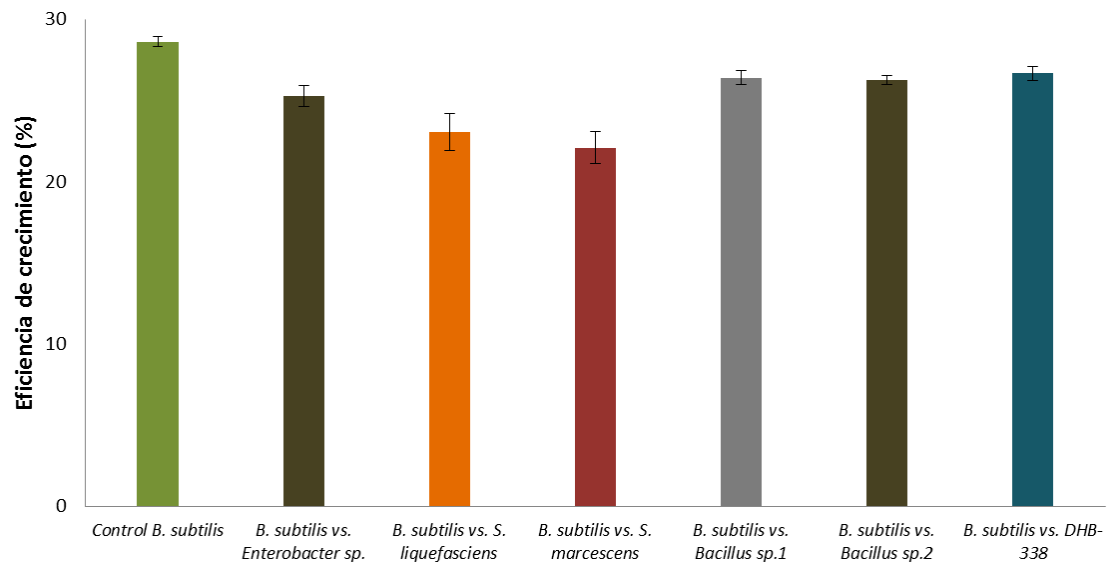


Figura 36. Eficiencia de crecimiento promedio de *Bacillus* sp.1 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.

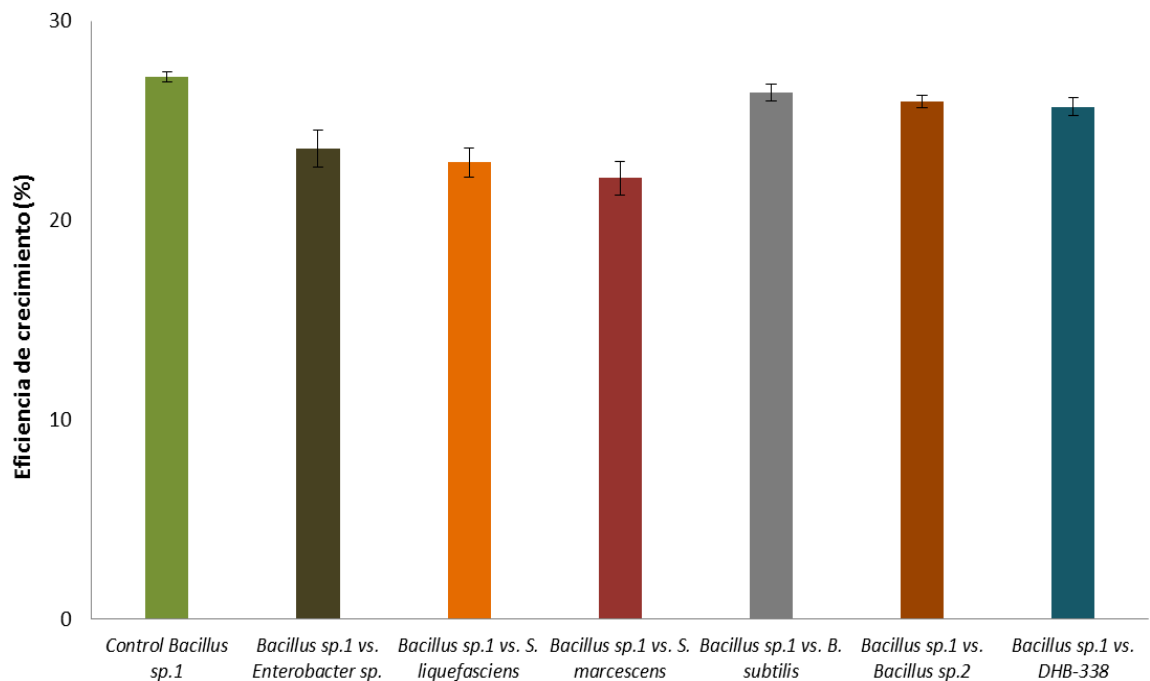
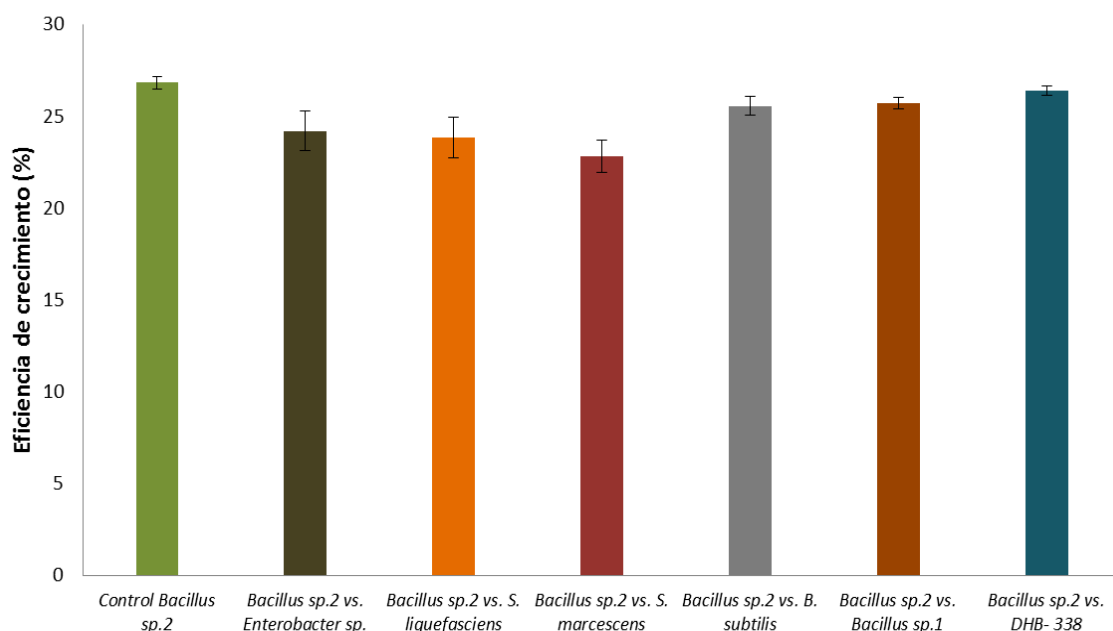


Figura 37. Eficiencia de crecimiento promedio de *Bacillus* sp.2 en los enfrentamientos con cada una de las bacterias. Las barras indican el error estándar con un porcentaje de confianza del 95%.



6. DISCUSIÓN

Esta investigación arrojó resultados positivos en relación con el potencial de los microorganismos aislados de desechos como controladores de la hormiga arriera *A. cephalotes*. La abundancia de las poblaciones de bacterias heterótrofas totales y hongos, en el material de desecho de colonias de *A. cephalotes*, puede estar relacionada con la alta calidad nutricional que los desechos representan para los microorganismos quimiorganótrofos, ya que son una fuente importante de materia orgánica. Además respalda la hipótesis de una alta eficiencia de esta hormiga para mantener la higiene de la colonia a través de estrategias comportamentales para evitar la diseminación de estos agentes que pueden comprometer la supervivencia de las colonias, entre ellas, la limpieza permanente

del jardín del hongo (Wilson, 1980; Currie & Stuart, 2001) y el manejo de estos materiales de desecho y la asociación con bacterias que inhiben el desarrollo de microorganismos potencialmente perjudiciales (Hölldobler & Wilson, 1990; Bot *et al.*, 2001; Hart & Ratnieks, 2001; Currie, 2001).

Las altas poblaciones de microorganismos perjudiciales en los desechos de las colonias usadas en este estudio, provienen, principalmente, de la limpieza que realizan las obreras del material vegetal usado como sustrato para el hongo simbiote, ya que éste se constituye en un reservorio de microorganismos ampliamente distribuidos y ubicuos. De igual forma, la cámara de cultivo del hongo simbiote puede tener una carga microbiana que es controlada por las obreras mediante la remoción y transporte hacia los desechos de los microorganismos que pueden significar un riesgo para la colonia (Giraldo, 2009).

En los jardines del hongo en otras especies de arriera, se da una asociación con hongos no mutualistas, como lo reportado para *Ac. octospinosus*, en la que se detectó la presencia de hongos Basidiomicetes y Ascomicetes en una estrecha relación con el hongo mutualista (Abril & Bucher, 2007; Van Borm *et al.*, 2002). Estudios previos indican que especies de hongos filamentosos como *Syncephalastrum racemosum* y *T. harzianum*, que se comportan como antagonistas no especializados de *L. gongylophorus*, así como levaduras del género *Cryptococcus*, encontradas como las más abundantes en los jardines de *A. texana*, son adquiridos del suelo y de las plantas que forrajea las obreras, en donde están asociadas como parte de las comunidades microbianas epífitas (Rodrigues *et al.* 2005; 2009).

Entre los hongos aislados a partir de los desechos, aquellos que mostraron un efecto antagónico y/o entomopatígeno, fueron compatibles con *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, dos morfoespecies de *Fusarium*, *Penicillium* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. Estos resultados concuerdan con investigaciones hechas en colonias de hormiga arriera de especies relacionadas.

Rodrigues *et al.* (2005), encontraron en colonias de campo y de laboratorio de *A. sexdens rubropilosa*, una alta riqueza de especies de hongos filamentosos asociados a los jardines del simbionte y los desechos cuando las colonias fueron sometidas a estrés. No obstante, sólo unas pocas especies se encontraron con valores altos de abundancia, entre ellas, *Escovopsis weberi*, *T. harzianum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Acremonium kiliense*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium citrinum*. Igualmente, *A. flavus* y *Mucor* sp. han sido recuperadas de muestras de jardines del hongo en colonias de *A. texana* en ausencia de cuidado por parte de las obreras (Rodrigues *et al.*, 2009).

Por su parte, Vélez (2008), encontró en la cámara de desechos en colonias de laboratorio de *A. cephalotes*, hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*, mientras que Giraldo (2009) registró la presencia de estos hongos en las hormigas de la cámara de alimentación y las habitantes de desechos, pero su presencia no fue observada en aquellas del jardín.

Penicillium sp. fue el hongo que con mayor frecuencia se encontró en este estudio, observándose en el 100% de las colonias en las dos evaluaciones hechas en el tiempo.

Además, presentó uno de los valores de abundancia promedio más elevados. La remoción de este microorganismo ha sido documentada en *A. sexdens*, en ensayos donde el hongo simbionte fue asperjado con esporas de *Penicillium* sp., generando un aumento de la actividad de limpieza por parte de las obreras (Bass & Cherret, 1994).

Localmente, en *A. cephalotes*, se demostró que obreras medianas removieron hasta un 75% de las esporas de este hongo, cuando se les permitió limpiar el material vegetal inoculado. Igualmente removieron hasta un 51% de esporas del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Peña, 2013).

Un alto porcentaje (77,7 %) de los aislados de hongos evaluados exhibió antagonismo sobre *L. gongylophorus*. A excepción de *Mucor* sp., en general el efecto antagónico se manifestó como una limitación del crecimiento sin evidencia de muerte del simbionte. La disminución de la viabilidad del simbionte en presencia de *Mucor* sp., posiblemente se deba a mecanismos combinados que involucran la producción de enzimas extracelulares y/o metabolitos tóxicos con propiedades antimicrobianas, tal como se ha documentado en especies antagónicas de hongos fitopatógenos (Askew & Laing, 1994; Marques *et al.*, 2006). Por el contrario, *Trichoderma* sp. *Pencillium* sp., *A. ochraceus*, *A. flavus* y las dos morfoespecies de *Fusarium*, inhibieron el crecimiento del simbionte sin comprometer su viabilidad. Este efecto antagónico puede deberse a diferentes mecanismos que no son suficientemente conocidos y que requieren ser investigados a profundidad.

Varios autores han demostrado la capacidad de diferentes cepas de hongos saprófitos de los géneros *Trichoderma*, *Acremonium*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* para limitar el desarrollo del hongo simbionte (Currie *et al.*, 1999; Ortiz & Orduz, 2000; Silva *et al.* 2006; Folgarait *et. al* 2011; Rengifo, 2012) aspecto que concuerda con los resultados del presente estudio. Sin embargo, pese a que en esos estudios se registra la actividad antagónica de varias cepas de *Escovopsis* sp., en la presente investigación no se evidenció su presencia ni en desechos, ni en las cámaras de cultivo del simbionte.

Esto corrobora las observaciones de Vélez (2008), Giraldo (2009) y, más recientemente, Rengifo (2012). Ninguno logró aislar a este micoparásito especializado, a pesar que ha sido ampliamente documentado como ubicuo en todas las especies de hormiga arriera y transmitido verticalmente como un parásito específico (Currie *et al.*, 1999; Currie & Stuart, 2001; Currie *et al.*, 2003). Esto nos lleva a sugerir la presencia de equivalentes ecológicos en las diferentes especies de hormigas cortadoras.

En contraposición, a nivel local se ha observado la muerte de colonias en condiciones naturales de *A. cephalotes* en zona rural de Cali y en colonias establecidas en condiciones de laboratorio, debido al crecimiento descontrolado de un hongo compatible con *Mucor* sp. (Giraldo com. pers.). Rengifo (2012), encontró que *in-vitro*, este mismo hongo tuvo una inhibición del 47% sobre el hongo simbionte. Estos hallazgos, sumados a los resultados derivados de este trabajo, donde los mayores porcentajes de inhibición fueron producidos por *Mucor* sp. (65,18%), generan interrogantes acerca de la posible especificidad de la

microbiota asociada a las colonias de hormiga arriera a nivel de especie y su eventual variación a nivel espacial y temporal.

Por otra parte, hay un menor conocimiento en relación con las comunidades bacterianas asociadas a estos insectos sociales, en parte por las dificultades de los métodos dependientes de cultivo, que subestiman la diversidad bacteriana y limitan el entendimiento de potencial papel que estos microorganismos cumplen en la ecología de estos insectos.

Resulta interesante, por ejemplo, la aparición frecuente y abundante en los desechos estudiados de *Serratia marcescens*, con la cual se ha demostrado que la hormiga arriera, *A. cephalotes* del Valle del Cauca, presenta una asociación simbiótica, implicada principalmente en la defensa del hongo mutualista (Giraldo, 2009; Rengifo, 2012; Ortiz, 2013). Giraldo (2009) registró que esta bacteria se mantiene asociada de manera persistente en todas las castas de obreras, inclusive en aquellas encargadas del transporte de desechos y las que habitan permanentemente sobre éstos, lo cual podría explicar, la presencia de *S. marcescens* en las cámaras de desechos. Sin embargo, la alta abundancia observada de esta bacteria, podría estar relacionada con la disponibilidad permanente de materia orgánica en el material de desecho y la presencia de microorganismos potencialmente contaminantes para el hongo mutualista.

Sin embargo, poco se ha documentado acerca de la variabilidad que puede existir en las bacterias asociadas como exosimbiontes entre especies de la tribu Attini, la dinámica de sus poblaciones y las estrategias que utilizan estas hormigas para mantener el equilibrio de

estas asociaciones, donde un mismo microorganismo, como *S. marcescens* en este estudio, puede actuar como mutualista o patógeno.

De manera similar, Poulsen *et al.* (2003) registraron experimentalmente la existencia de diferencias en la abundancia de la bacteria simbiote *Pseudonocardia*, entre las especies simpátricas *Ac. octospinosus* y *Ac. echinatio*. Además, evidenciaron que las obreras mayores presentan valores más altos de abundancia de esta bacteria que las obreras menores y que dicha abundancia se ve incrementada con la presencia del parásito especializado, *E. weberi* (Currie, 2001).

Así mismo, en un estudio realizado con obreras de diferentes edades en la especie *Ac. octospinosus*, se observó que los máximos valores de abundancia de *Pseudonocardia* se alcanzaban de 2-3 semanas de edad, declinando gradualmente a medida que las obreras maduraban. Se observó una correlación negativa entre la abundancia de esta bacteria y su sensibilidad a los compuestos antimicrobianos de la glándula metapeural (Poulsen *et al.*, 2003).

Lo anterior pone, una vez más, de manifiesto que las interacciones simbióticas entre microorganismos y hormigas son bastante complejas y dinámicas, y que pueden estar sujetas a mecanismos de autorregulación. En este aspecto, los resultados arrojados por las evaluaciones del potencial antagónico de los microorganismos aislados de los desechos, refuerzan la hipótesis de que la bacteria *S. marcescens*, asociada con *A. cephalotes* cumple funciones análogas a las registradas para actinobacterias en otras especies de hormiga

relacionadas (Currie *et al.*, 2003; Poulsen *et al.*, 2003; Pagnocca *et al.*, 2008) y, por lo tanto, podrían ser considerados equivalente ecológicos.

En las pruebas de enfrentamiento entre *S. marcescens* y los aislados de hongos y bacterias seleccionados, sólo se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de esta bacteria, en presencia del hongo *A. flavus*, indicando su capacidad de responder a las presiones de selección generadas por microorganismos potencialmente perjudiciales que ingresan constantemente a las colonias. Sin embargo, fue evidente un cambio en la coloración roja característica de *S. marcescens*, en presencia de *A. flavus*, por lo que es plausible inferir que este hongo tenga un mecanismo que esté interfiriendo con la expresión de la prodigiosina y que, consecuentemente, pueda tener un efecto sobre sus propiedades antimicrobianas, las cuales son ampliamente conocidas (Tanada & Kaya, 1993; Deorukhkar *et al.*, 2007). Sin embargo, esta especulación deberá ser evaluada experimentalmente para obtener resultados contundentes que permitan corroborarla.

Por otra parte, *A. flavus* junto con *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.1, produjeron altos valores de mortalidad acumulada en las obreras tratadas, tanto en las aplicaciones por contacto, como cuando se les suministró en la dieta. Resultados similares han sido registrados en otros estudios. Mena (2011), aisló los hongos *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp y *Fusarium* sp. a partir de los desechos y cadáveres de *A. colombica* e igualmente demostró su capacidad entomopatógena sobre obreras mayores en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los valores de mortalidad alcanzados no superaron en ningún

caso el 50%, contrario a lo obtenido para los aislamientos de *Metarhizium* sp. con los que se llegó a obtener porcentajes de mortalidad del 100%.

El género *Aspergillus* posee una variedad de especies patógenas oportunistas, aunque ninguna es exclusivamente entomopatógena (Johansson *et al.*, 2013). En obreras de *A. texana* y *Ac. equinator* se ha documentado la presencia de *A. flavus* como patógeno (Hughes & Van Borm *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2005), mientras que en *A. bisphaerica*, *A. ochraceus* se encontró causando hasta un 50% de mortalidad (Ribeiro *et al.*, 2012).

Los hongos evaluados en esta investigación se constituyen en promisorios, debido a su capacidad de afectar las colonias a través de la disminución del crecimiento del hongo simbiote, su capacidad insecticida y, en el caso de *A. flavus*, su múltiple efecto sobre el hongo mutualista, las obreras, y la capacidad potencial de alterar la función de la bacteria *S. marcescens*, implicada en la defensa de las colonias.

La actividad insecticida de estos aislados de hongos, demostró diferencias importantes en comparación con cepas de uso comercial de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en relación con las variables mortalidad acumulada, tiempo letal medio (TL₅₀) y porcentaje de colonización. *A. flavus*, *A. ochraceus* y *Penicillium* sp., produjeron una mortalidad acumulada superior o comparable con la producida por estos dos entomopatógenos, pero presentaron diferencias marcadas en el TL₅₀ y el porcentaje de colonización, siendo considerablemente menor el tiempo letal medio en estos tres aislados

nativos que en las cepas comerciales. De forma similar, los porcentajes de colonización fueron mayores en los aislados nativos.

Estos resultados son relevantes, debido a que estas variables son clave al momento de definir la capacidad entomopatogénica de una especie microbiana y su potencialidad para controlar efectivamente el organismo blanco en condiciones naturales (Gutiérrez *et al.*, 2005; Mena, 2011). Una posible explicación a la disminuida actividad insecticida de las cepas de uso comercial de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, es la inactivación de las esporas de estos hongos, por acción de las secreciones de las glándulas metapleurales y mandibular presentes en las obreras, las cuales tienen propiedades antimicrobianas sobre un amplio rango de microorganismos (Bot *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2009). Además, se comprobó que estas mismas cepas son inhibidas, aunque en diferente medida, por la bacteria simbiote de *A. cephalotes*, *S. marcescens* (Ortíz, 2013).

Estos dos hongos, son bastante generalistas y tienen baja especificidad en su acción sobre hormigas. El hecho de que se utilicen de manera extensiva para el control de hormiga arriera (Brinkman & Gardner, 2000; Pérez, 2002; Escobar *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2007; López & Orduz, 2003), posiblemente ha ejercido presiones de selección que han inducido este tipo de respuesta como estrategia para sobreponerse a las perturbaciones. En consecuencia, el control con microorganismos nativos, como los evaluados en esta investigación, pueden tener una mayor efectividad, dada la presumible menor adaptación que las hormigas tienen para afrontar un ataque con éstos. Sin embargo, esta presunción

debe evaluarse experimentalmente en estudios futuros que permitan dilucidar los mecanismos implicados en la defensa y las estrategias para alterarlos.

En lo referente a los aislados de bacterias que demostraron actividad insecticida, hubo una tendencia a presentarse mayores valores de mortalidad al suministrar estas bacterias en la dieta. Esto puede deberse a un efecto de sobreexposición, en comparación con las aplicaciones por contacto, debido a que las hormigas ingirieron las bacterias durante el tiempo de duración de los ensayos. Un patrón similar fue observado por Aubad-López (2010) en evaluaciones de la capacidad insecticida de extractos vegetales sobre obreras de *A. cephalotes*. Esta autora encontró que el efecto insecticida solo se observó cuando las hormigas ingirieron las fracciones vegetales.

En contraste, en los ensayos con los aislados de hongos, no se evidenció esta tendencia y, en general, fue mayor la mortalidad en los tratamientos por contacto. Esto es un factor a tener en cuenta en la selección del método de aplicación de los microorganismos sobre las colonias, bien sea en condiciones de laboratorio o naturales, ya que en este tipo de ensayos no es posible garantizar la ingestión de los microorganismos y se ha demostrado que las obreras exhiben respuestas diferenciales a los métodos de control que incluyen formulaciones con cebos, los cuales en muchos casos no son ingresados fácilmente a los nidos (Montoya-Lerma *et al.*, 2012).

En general, a excepción de los dos aislados de *Bacillus*, las bacterias exhibieron una reducida capacidad antagónica sobre el crecimiento de *L. gongylophorus*. Sin embargo,

varios de los aislados demostraron una actividad insecticida, con porcentajes de mortalidad significativamente altos, aunque con mecanismos de acción más lentos, lo que se evidenció en los mayores valores de tiempo letal medio y menores porcentajes de colonización en comparación con los aislados de hongos. Posiblemente esta acción retardada de las bacterias se asocie con su baja capacidad para penetrar la pared celular de estos insectos y generar una infección generalizada en corto tiempo, debido a que no son entomopatógenos altamente virulentos (Tanada & Kaya 1993) y su efecto puede llegar a ser más bien dependiente de la abundancia.

Los aislados con potencial insecticida fueron compatibles con *Enterobacter* sp., *S. liquefasciens* y *S. marcescens*, familia Enterobacteriaceae, y *Bacillus subtilis* y dos cepas de este mismo género de Bacillaceae. Diversas especies de estas dos familias han sido aisladas, demostrando su capacidad patógena para diferentes especies de insectos bajo condiciones de laboratorio, siendo *B. thuringiensis* la de más amplio uso en el control de insectos de diferentes órdenes, entre ellos, Diptera, Coleoptera y Lepidoptera (Burges, 1982; Muratoglu *et al.*, 2011).

Los estudios que documentan una alta mortalidad de larvas en *Drosophila melanogaster* tratadas con *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* (Kyhami-Horani, 2002), en lepidópteros, debido a *B. megaterium* (Sevim *et al.*, 2010) y en coleópteros por *B. cereus* (Sezen *et al.*, 2004), respaldan el potencial insecticida de los aislados del género *Bacillus* encontrado en esta evaluación. Sin embargo, es necesario tener cautela en cuanto que en hormigas no se ha referenciado este género como un biocontrolador. Incluso, en la hormiga de fuego,

Solenopsis invicta, se ha documentado *Bacillus* sp. como endosimbionte del intestino, presumiblemente transmitido verticalmente por las reinas (Ishak *et al.*, 2011). En el caso específico de *A. cephalotes*, Giraldo (2009), registró la presencia de bacterias del género *Bacillus*, así como *Enterobacter* y *S. liquefasciens*, asociadas al cuerpo de las obreras de diferentes castas de esta hormiga y sugirió una posible asociación con dichos microorganismos.

En general el género *Enterobacter* ha sido referenciado como endosimbionte no patógeno en algunas especies de insectos como *Anopheles*, en los cuales incluso se ha sugerido que influyen sobre su competencia vectorial (Patil *et al.*, 2011). En hormigas *Solenopsis*, *Enterobacter* junto con *Serratia* y *Bacillus* han sido identificados como endosimbiontes intestinales, implicados en digestión de moléculas complejas (Boursaux-Eude & Gross, 2000; Zientz *et al.*, 2005).

En algunos insectos, se ha llegado a observar patologías asociadas a la presencia de *Enterobacter* sp. cuando coloniza estructuras diferentes al intestino, como el hemocele (Dillon & Dillon, 2004). La capacidad insecticida de *Enterobacter* sp. demostrada en el presente trabajo, podría ser explicada en parte, por la expresión de enzimas con actividad endoquitinasa y exoquitinasa (Shuang *et al.*, 2010) o estar relacionada con patologías oportunistas cuando las obreras están bajo condiciones de estrés.

Dentro del género *Serratia*, varias especies han sido registradas como entomopatógenas de una gran variedad de especies de insectos de diferentes órdenes. Por ejemplo, *S.*

entomophila y *S. proteamaculans* tienen la capacidad de expresar un complejo proteico tóxico que causa el cese de la actividad enzimática proteolítica en el intestino de estados larvales en *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae), una importante plaga agrícola en Nueva Zelanda (Grimont *et al.*, 1998; Jackson, 2007; Gatehouse *et al.*, 2008).

En México, Nuñez-Valdez *et al.* (2008), aislaron cepas nativas de *S. entomophila* y demostraron su capacidad patogénica sobre larvas de *Phyllophaga* y *Anomala* (Coleoptera: Scarabaeidae), plagas subterráneas de impacto económico. *S. marcescens* y *S. liquefaciens* pueden causar septicemias en insectos, debido a la existencia de plásmidos de virulencia que codifican para la expresión de compuestos que causan citotoxicidad y degradación celular (Waterfield *et al.*, 2005).

De otro lado, la prodigiosina expresada por *S. marcescens* ha demostrado tener actividad larvicida en *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi*, afectando las tasas de supervivencia de larvas, de la población total y la emergencia de adultos de estos mosquitos (Patil *et al.*, 2011).

En ensayos con tres especies de artrópodos, se demostró la capacidad de *S. marcescens* para disuadir el consumo de alimento previamente tratado con soluciones que contenían células viables de esta especie (Gulcu *et al.*, 2012). Por el contrario, en esta investigación, se pudo observar que las hormigas a las que se les suministró la dieta con una concentración alta del aislado nativo de esta bacteria, tuvieron un consumo rápido.

Es posible que las obreras sean capaces de reconocer esta bacteria, dada su estrecha asociación. No obstante, los resultados de este trabajo permiten sospechar que la función de *S. marcescens* como simbiote de las obreras de *A. cephalotes* sea dependiente de la abundancia de esta bacteria en la cutícula de las hormigas o de su capacidad para expresar la prodigiosina de manera diferencial, indicando que las poblaciones y el metabolismo de esta bacteria pueden ser autorreguladas. Esto explicaría el hecho que pueda comportarse bien sea como simbiote o como patógena oportunista. Esta presunción, se basa en la evidencia de la capacidad insecticida de esta bacteria cuando se aplicó a las obreras en poblaciones altas en este estudio. Sin embargo, para dilucidar esto, es necesario realizar investigaciones detalladas que permitan entender los mecanismos implicados en la dinámica de esta asociación y su regulación.

Además, *Serratia* y en particular *S. marcescens* tienen una variedad de enzimas extracelulares, entre ellas una de las más eficientes quitinasas (Shuang, 2010), a lo que puede atribuirse su potencial insecticida en las aplicaciones por contacto. De otro lado, se ha demostrado una actividad sinérgica entre la actividad quitinolítica y la producción de prodigiosina, en la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Nobutaka *et al.*, 2001).

Un efecto comparable podría estarse presentando en la actividad de *S. marcescens* asociada a *A. cephalotes*, sobre algunos de los hongos con potencial patógeno evaluados en este estudio. En las pruebas de coexistencia, se observó un efecto negativo de *S. liquefasciens* y *S. marcescens* sobre los dos aislados de *Fusarium* (*Fusarium* sp.1 y *Fusarium* sp.2); sin

embargo, no se encontró un efecto sobre *A. flavus*, *A. ochraceus* ni sobre *Penicillium* sp. Estos tres hongos tuvieron los mayores efectos sobre la supervivencia de las obreras y demostraron una actividad antagónica significativa sobre el hongo mutualista. Igualmente, se encontró a *A. flavus* afectando la eficiencia de crecimiento y la producción de pigmento en *S. marcescens*.

En particular, este hecho es de gran relevancia, debido a que *A. flavus* es bastante promisorio por su potencial para afectar la estabilidad de las colonias de hormiga arriera, *A. cephalotes*, a través de la alteración del equilibrio de la asociación entre *S. marcescens* y las obreras, el crecimiento del hongo simbionte y el marcado efecto sobre la supervivencia de las hormigas. Es, además, de gran importancia el hecho de que *A. ochraceus* y *Penicillium* no sean inhibidos por *S. marcescens*, como si se afectan los hongos de uso comercial *B. bassiana* y *M. anisopliae*, lo que hace pensar que un método de control que incluya estos tres hongos, redundará en una mayor eficacia en comparación con lo que tradicionalmente se ha utilizado en Colombia para el control microbiológico de hormiga arriera.

En cuanto a la capacidad de coexistencia entre los microorganismos que resultaron tener potencial antagónico y/o insecticida, los hongos *Trichoderma* sp., *Mucor* sp. y en menor medida *A. flavus*, tuvieron una reducida capacidad para crecer conjuntamente con los otros aislados, debido a su efecto negativo sobre la eficiencia de crecimiento de los otros microorganismos. Igualmente, las bacterias *S. marcescens*, *S. liquefasciens* y uno de los aislados del género *Bacillus* (*Bacillus* sp.2) tuvieron, aunque en menor medida, algún efecto de reducción del crecimiento de los microorganismos con que se enfrentaron.

Con base en estos resultados, una posible formulación puede incluir las bacterias *Enterobacter* sp., *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *Bacillus subtilis*, las dos cepas del género *Bacillus* (*Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.2), así como los hongos *Fusarium* sp.1, *Fusarium* sp.2, *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. *Penicillium* sp., *A. ochraceus* y *A. flavus*. La inclusión de *Mucor* sp., *Trichoderma* sp. y *A. flavus*, como parte de una misma mezcla, deberá ser reevaluada, debido a que estos hongos presentaron los niveles más bajos de coexistencia con los demás microorganismos.

Esta capacidad de coexistir es un factor importante en la búsqueda de las formas más apropiadas para diseñar productos biológicos y establecer las vías de aplicación, partiendo de la factibilidad de realizar mezclas sin que se comprometa la viabilidad de los microorganismos y la actividad deseada. Al igual, que la evaluación de la inocuidad de estos microorganismos sobre las personas y sobre poblaciones de insectos no blanco.

Finalmente, los resultados derivados de esta investigación establecen una línea base para investigaciones posteriores que incluyan el desarrollo de una formulación de conjugados microbianos y la evaluación de su efectividad sobre colonias de hormiga arriera inicialmente en laboratorio y luego bajo condiciones naturales. Esto, contribuirá con el desarrollo de herramientas para el manejo integrado de las hormigas cortadoras, con la proyección de lograr una alternativa a los productos químicos, que represente, mayor efectividad y un menor impacto para el medio ambiente.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los aislados nativos compatibles con *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus* y dos especies bacterianas del género *Bacillus*, tienen potencial antagónico sobre el hongo *L. gongylophorus*, mutualista de la hormiga arriera, *Atta cephalotes*.

El hongo *A. flavus* inhibe el crecimiento de la bacteria simbiote *S. marcescens*, y afecta la expresión de la prodigiosina, por lo cual se considera promisorio para la alteración de la relación simbiótica entre la bacteria y las obreras, y su hallazgo permite dilucidar estrategias de manejo que permitan romper algunos mecanismos de defensa especializados de las hormigas y dejarlas susceptibles al ataque de otros microorganismos con capacidad entomopatógena o antagonista.

Los hongos *A. flavus*, *Penicillium* sp., *A. ochraceus* y *Fusarium* sp., al igual que las bacterias *Enterobacter* sp., *Serratia liquefaciens*, *S. marcescens*, *Bacillus subtilis* y dos especies más del género *Bacillus*, presentaron actividad insecticida sobre obreras de *A. cephalotes*, sugiriendo que algunos microorganismos saprófitos pueden comportarse como patógenos bajo condiciones apropiadas de aplicación.

Los microorganismos con actividad antagónica y/o entomopatógena tuvieron una respuesta variable en su capacidad de coexistir, siendo *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., y *A. flavus* los que mostraron los menores grados de coexistencia. Esto genera interrogantes acerca de las

posibilidades de utilizarlos como parte de una formulación comercial simple en la que puedan mezclarse. Sin embargo, determina algunas pautas para avanzar en técnicas especializadas de encapsulamiento y aplicación, que permitirían integrar microorganismos de diferente naturaleza en la elaboración de productos biológicos especializados.

Se recomienda adelantar investigaciones que incluyan la búsqueda de formulaciones a base de conjugados con los microorganismos resaltados como promisorios y la evaluación de su efectividad en condiciones de laboratorio, así como su validación en campo. Lo anterior, como uno de los aspectos clave para avanzar en la búsqueda de métodos de control biológico eficaces de la hormiga arriera, *A. cephalotes*.

8. LITERATURA CITADA

ABRAMOWSKI, D., CURRIE, C.R. & POULSEN, M. 2011. Caste specialization in behavioral defenses against fungus garden parasites in *Acromyrmex octospinosus* leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux*. 58: 65-75.

ABRIL, A.B & BUCHER, E.H. 2007. Genetic diversity of fungi occurring in nests of three *Acromyrmex* leaf-cutting ant species from Córdoba, Argentina. *Microbial Ecology*. 45: 417-423

APHA, AWWA, WPCF. 2004. Versión 21.0. Standard methods for the examination of water and wastewater, Washington. EEUU.

ASKEW, D.J. & LAING, M.D. 1994. The *in vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant Soil*. 159: 277-81.

- ASSELBORN, V.M., ZALOCAR, Y. & PARODI, E. 2000. Efectos del insecticida organofosforado clorpirifos sobre el crecimiento y morfología de *Selenastrum caapricornutum* printz (Chlorophyta). Comunicaciones científicas Chaco-Corrientes.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Cuarta edición. Addison Wesley. Madrid, España. 696 p.
- AUBAD-LÓPEZ, P. 2010. Plantas usadas por las comunidades indígenas Ticuna del PNN Amacayacu para el control de la hormiga cortadora: Evaluación biológica y búsqueda de metabolitos secundarios. Tesis de Maestría. Medellín. Colombia. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 125 p.
- AYLWARD, F.O., BURNUM-JOHNSON, K.E., TRINGE, S.G., TEILING, C., TREMMEL, D.M., MOELLER, J.A., SCOTT, J.J., BARRY, K.W., PIEHOWSKI, P.D. & NICORA, C.D. 2013. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (12): 3770-3778
- BASS, M. & CHERRETT, J.M. 1994. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecological Entomology*. 19: 215-220.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B. 2003. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Burgess Publishing Company. Estados Unidos. 217 p.
- BELLARI, S., FARJI-BRENER, A.G. & TADEY, M. 2007. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behavior and location of external refuse dumps. *Journal of Insect Behavior*. 20(1): 87-98.
- BONFANTI, P., COLOMBO, A., ORSI, F., NIZZETO, I., ADRIOLETTI, M., BACCHETTA, R., MANTECCA, P., FASCIO, U., & VISMARA, C. 2004. Comparative taratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic toxicology*. 70:189-200.
- BOT, A.N.M., OBERMAYER, M.L., HÖLLDOBLER, B. & BOOMSMA, J.J. 2001. Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insectes Sociaux*. 48: 63-66.
- BOURSAUX-EUDE, C. & GROSS, R. 2000. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Research in Microbiology*. 151: 513-519.
- BRINKMAN, M.A. & GARDNER, W.A. 2000. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* to red imported fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae) infected with *Thelehanthia solenopsae*. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. 17(4): 191-195.

- BUENO, O.C., HEBLING, M.J.A., SILVA, O.A. & MATENHAUER, A.M.C. 1997. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hym., Formicidae). *Journal of Applied Entomology*. 119(1): 341-343.
- BURGES, H.D. 1982. Control of insects by bacteria. Cambridge Journals. *Parasitology*. 84: 79-117.
- BUTT, T.M., JACKSON, C. & MAGAN, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International Publishing, Wallingford. pp. 1-8.
- CAÑEDO, V. & AMES, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Publicación Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima – Perú. p. 62.
- CARROLL, C.R. 1990. The interference between natural areas and agroecosystems. En: CARROLL, C.R., VANDERMEER, J.H. & ROSSET, P.M. eds. *Agroecology*. Mc Graw-Hill. pp. 365-383.
- CASTAÑO-QUINTANA, K. J.; MONTROYA-LERMA, J. & GIRALDO, C. 2013. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. *Industrial Crops and Products*. 44: 391-395.
- CHARUDATTAN, R. 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*. 46: 229-260.
- CHERRETT, J.M. 1968. The Foraging Behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Animal Ecology*. 37(2): 387-403.
- CURRIE, C.R. 2001. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology*. 55: 357-380.
- CURRIE, C.R., BOT, A.N. & BOOMSMA, J.J. 2003. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*. 101: 91-102.
- CURRIE, C.R., MUELLER, U.G. & MALLOCH, D. 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. 96: 7998-8002.
- CURRIE, C.R. & STUART, A.E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 268: 1033-1039.
- DE MELO CAZAL, C., DE CÁSSIA, V., BATALHAO, J.R., BUENO, O.C., RODRIGUES, E., FERNANDES DA SILVA, M.F., VIEIRA, P.C. & FERNANDES, J.B.

2009. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216: 4307-4312.

DELLA LUCÍA, T.M.C. 2003. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. En: FERNÁNDEZ, F. ed. Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. Colombia. pp. 337-349.

DELLA LUCÍA, T.M.C. 2011. Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo. 1 ed. Viçosa, UFV. 420 pp.

DEORUKHKAR, A.A., CHANDER, R., GHOSH, S.B. & SAINIS, K.B. 2007. Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology* 158 : 399-404

DIAMOND, J. 1998. Ants, crops and history. *Science*. 281(5385): 1974-1975.

DILLON, R.J., VENNARD, C.T. & CHARNLEY, A.K. 2002. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 759-763.

DILLON, R.M. & DILLON, V.R. 2004. The gut bacteria of insect: non-pathogenic interaction. *Annual Review of Entomology*. 49:71-92.

DOMAGALSKI, J.L. & MUNDAY, C. 2003. Evaluation of Diazinon and Chlorpyrifos Concentrations and Loads, and Other Pesticide Concentrations, at Selected Sites in the San Joaquin Valley, California, April to August, 2001. United States Geologic Survey.

ESCOBAR, R., GARCÍA, F., RENTERÍA, N.Y. & NEITA, J.C. 2002. Manejo y control de hormiga arriera (*Atta* spp. y *Acromyrmex* spp.) en sistemas de producción de importancia económica en el departamento del Chocó, Quibdó. Cartilla No. 2. 22 pp.

FARIA, M. & WRAIGHT, S.P. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*. 20: 767-778.

FERNÁNDEZ, F. 2003. Introducción a las hormigas de la región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá, Colombia. 423 pp.

FERNÁNDEZ, J.V. & JAFFE, K. 1995. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. Elementos para o manejo da praga. *Anais Sociedade Entomológica do Brasil*. 24: 287-289.

- FOLGARAIT, P., MARFETÁN, J.A. & CAFFARO, M.J. 2011. Growth and conidation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology*. 40: 342-349.
- FORTI, L.C., PROTTI, A.P. & RAMOS, V.M. 2000. Biología e comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae): implicações no seu controle. *Série Técnica IPEF*. 13: 103-114.
- GALLO-DELGADO, S.M., PALACIO-BAENA, J.A. & GUTIERREZ-C, P.D. 2006. Efectos del insecticida clorpirifos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae). *Actualidades Biológicas*. 28(4):51-58.
- GATEHOUSE, H.S., MARSHALL, D.G., SIMPSON, R.M., GATEHOUSE, L.N., JACKSON, T.A. & CHRISTELLER, J. T. 2008. *Serratia entomophila* inoculation causes a defect in exocytosis in *Costelytra zealandica* Larvae. *Insect Molecular* 17 (4): 375–385
- GETZIN, L. W. 1981. Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *Journal of Economic Entomology*. 74:158–162.
- GIRALDO, D.L. & PALACIO, J.A. 1999. Efectos del clorpirifos sobre la supervivencia y reproducción de *Daphnia pulex*. *Actualidades Biológicas*. 21(71):123-130
- GIRALDO, C. 2009. Microbiota asociada a la casta obrera de hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Universidad del Valle, Cali. 86 pp.
- GODOY, M.F.P., VICTOR, S.R., BELLINI, A.M., GUERREIRO, G., ROCHA, W.C., BUENO, O.C., HEBLING, M.J.A., BACCI, M., Da SILVA, M.F.G.F., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B. & PAGNOCCA, F.C. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal Brazilian of Chemical Society*. 16(3b): 669-672.
- GRIMONT, P.A.D., JACKSON, T.A., AGERON, E. & NOONAN, M.J. 1998. *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 38(1): 1-6.
- GUEDES, F.L.A., ATTILI-ANGELIS, D. & PAGNOCCA, F.C. 2011. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). *Folia Microbiologica*. 57(1): 21-26.
- GUTIÉRREZ, G.A.I., SILDARRIAGA, O.Y., URIBE, S.S., ZULUAGA, A.M.P. & PINEDA, G.F. 2005. Patogenicidad de *Paecilomyces lilacinus* y *Metarhizium anisopliae* sobre termitas *Microcerotermes* sp. (Isoptera: Termitidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 31(1): 9-14.

- GULCU, B., HAZIR, S. & KAYA, H.K. 2012. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110: 326-333.
- HAJEK, H.A. & ST. LEGER, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- HART, A.G. & RATNIEKS, F.L.W. 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalization collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 49: 387-392.
- HOLLDÖBLER, B. & WILSON, E.O. 1990. The ants. Cambridge, Harvard University Press. 420 pp.
- HOLLDÖBLER, B. & WILSON, E.O. 2011. The leafcutter ants. 1^a. Ed. W. W. Norton & Company. EE. UU. 160 pp.
- ISHAK, H.D., PLOWES, R., SEN, R., KELLNER, K., MEYER, E., ESTRADA, D.A., DOWD, S.E. & MUELLER, U.G. 2011. Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. *Microbial Ecology*. 61:821-831.
- JOHANSSON, H., DHAYGUDE, K., LINDSTROM, S., HELANTERA, H. & SUNDSTROM, L. 2013. A metatranscriptomic approach to the identification of Microbiota Associated with the ant *Formica exsecta*. *Public Library of Science PLoS ONE*. 8(11): e79777. doi:10.1371/journal.pone.0079777
- KAY, S.J. & STEWART, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology*. 43: 371-77.
- KYHAMI-HORANI, H. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* to laboratory populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Basic Microbiology*. 42: 105-10.
- JACKSON, T.A. 2007. A novel bacterium for control of grass grub. En: VINCENT, C., GOETTEL, M.S. & LAZAROVITS, G. eds. Biological control: A global perspective. CABI Publishing, Wallingford, RU. pp. 160-168.
- LIMA MENDOÇA, A., DA SILVA, C.E., TORRES DE MESQUITA, F.L., DA SILVA CAMPOS, R., DO NASCIMENTO, R.R., AZEVEDO, E.C. & SANTANA, A.E. 2009. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95: 295-303.

LÓPEZ, E. & ORDUZ, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*. 27: 194-200.

LÓPEZ, E. & ORDUZ, S. 2004. *Metharizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4: 71-78.

MACKAY, W. & MACKAY, E. 1986. Las hormigas de Colombia: arrieras del genero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 12: 23-30.

MARQUES, M.R., BUCKERIDGE, M.S., BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 2006. Characterization of an extracellular endopolygalacturonase from the saprobe *Mucor ramosissimus* Samutsevisch and its action as trigger of defensive response in tropical plants. *Mycophatologia*. 162: 337-346.

MARSARO, A.L.JR., DELLA LUCIA, T.M.C., BARBOSA, L.C.A., MAFFIA, L.A. & MORANDI, M.A.B. 2001. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. *Neotropical Entomology*. 30: 403-406.

MAURO, R.E. & ZHANG, L. 2007. Unique insights into the actions of CNS agents: Lessons from studies of chlorpyrifos and other common pesticides. *Central Nerv Systems Agents*. 7(3):183-199.

MENA, S. 2011. Evaluación de hongos entomopatógenos como potencial biocontrolador de la hormiga arriera *Atta colombica* del municipio de Iloró – chocó. Tesis de maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 88 p.

MOLLER, I.E., DE FINE LICHT, H.H., HARHOLT, J. & BOOMSMA, W .G. 2011. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. *Public Library of Science PLoS ONE*. 6(3): 17506.

MONTOYA-LERMA, J., CHACÓN de ULLOA, P. & MANZANO, M.R. 2006. Caracterización de nidos de la hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) en Cali (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*. 32(2): 151-158.

MONTOYA-LERMA, J., GIRALDO-ECHEVERRY, C., ARMBRECHT, I., FARJIBRENER, A. & CALLE, Z. 2012. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*. 58(3): 225-247.

MOULAERT, A. & ARGUEDAS, M. 1993. Insectos herbívoros asociados a diez especies forestales nativas en región Huetar Norte de Costa Rica. *Revista Forestal Centroamericana*. 2(1): 24-26.

- MUELLER, U.G., GERARDO, N.M., AANEN, D.K., SIX, D.L. & SCHULTZ, T.R. 2005. The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 36: 563-595.
- MUELLER, U.G., MIKHEYEV, A.S., HONG, E., SEN, R., WARREN, D.L., SOLOMON, S.E., ISHAK, H.D., COOPER, M., MILLER, J.L., SHAFFER, K.A. & JUENGER, T.E. 2011. Evolution of cold-tolerant fungal symbionts permits winter fungiculture by leafcutter ants at the northern frontier of a tropical ant-fungus symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 108(8): 4053-4056.
- MUELLER, U.G., SCHULTZ, T.R., CURRIE, C.R., ADAMS, R.M. & MALLOCH, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology*. 76(2): 169-197.
- MURATOGLU, H., SEZEN, K. & DEMIRBAG, Z. 2011. Determination and pathogenicity of the bacterial flora associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Turkish Journal of Biology*. 35: 9-20.
- NOBUTAKA, S., MASAMI, N., KAZUYUKI, H., TADAAKI, H. & KATSUMI, A. 2001. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*. 67: 312-319.
- NUÑEZ-VALDEZ, M.E., CALDERÓN, M.A., ARANDA, E., HERNÁNDEZ, L., RAMÍREZ-GAMA, R.M., ZITLHALLY, L.L., GUTIÉRREZ, M DEL C. & VILLALOBOS, F.J. 2008. Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 802-810
- ORTÍZ, D. 2013. Actividad de *Serratia marcescens* sobre tres hongos de uso comercial para el control biológico de la hormiga arriera, *Atta cephalotes*. Trabajo de pregrado en Biología. Universidad del Valle, Cali. 58 pp.
- ORTÍZ, A. & GUZMÁN, G.E. 2007. Las hormigas cortadoras de hojas en el departamento de Antioquia. Universidad de Antioquia, Secretaría de Agricultura de Antioquia, Gobernación de Antioquia, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 112 pp.
- ORTÍZ, A. & ORDUZ, S. 2000. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*. 150: 53-60.
- PAGNOCCA, F.C., RODRIGUES, A., NAGAMOTO, N.S. & BACCI, M. 2008. Yeast and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94: 517-526.

PATIL, C.D., PATIL, S.V., SALUNKE, B.K. & SALUNKHE, R.B. 2011. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*. 109:1179–1187.

PEÑA, S. 2013. Efecto de la limpieza del sustrato vegetal por la casta obrera en colonias de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). Trabajo de pregrado. Departamento de Biología. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 49 p.

PÉREZ, R.P. 2002. Lucha biológica contra la bibijagua (*Atta insularis* Güerin). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Laboratorio de Manejo de Plagas. La Habana, Cuba. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/ATTA-BIO.htm>. Fecha de consulta: 24 de febrero de 2013.

POULSEN, M., BOT, A.N.M., CURRIE, C.R., NIELSEN, M.G. & BOOMSMA, J.J. 2003. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Functional Ecology*. 17: 260-269.

QUIRAN, E.M., CORRO, B.M. & CARAMUTI, V. 2001. Determinación preliminar de subcastas en obreras de *Acromyrmex lobicornis* Emery 1887 (Hymenoptera: Formicidae). *Gayana*. 65(1): 19-25.

RACKE, K. D., COATS, J. R., & TITUS, K. R. 1988. Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2- pyridinol, in soil. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*. 23:527–539.

RAUH, V.A., PERERA, F.P., HORTON, M.K., WHYATT, R.M., BANSAL, R., HAO, X., LIU, J., BARR, D.B., SLOTKIN, T.A. & PETERSON, B.S. 2012. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 109(20): 7871-7876.

REBER, A., PURCELL, J., BUECHEL, S.D., BURI, P. & CHAPUISA, T.M. 2011. The expression and impact of antifungal grooming in ants. *Journal of Evolutionary Biology*. 24: 954-964.

RENGIFO, M. 2012. Actividad de *Serratia marcescens* sobre la microbiota asociada a colonias artificiales de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). Tesis de pregrado en Biología. Universidad del Valle, Cali.

RIBEIRO, M.M.R., AMARAL, K.D., SEIDE, V.E., SOUZA, B.M.R. & DELLA LUCIA, T.M.C., TEREZINHAM, C., KASUYA, M.C.M. & DE SOUZA, D.J. 2012. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche*. 51: 432-438.

- RODRIGUES, A., PAGNOCCA, F.C., BACCI JR, M., HEBLING, M.J.A., BUENO, O.C. & PFENNING, L.H. 2005. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiológica*. 50: 421-425.
- RODRIGUES, A., CABLE, R., MUELLER, U.G., BACCI, M & PAGNOCCA, F.C. 2009. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96:331–342.
- RODRÍGUEZ, A., VIANA, A., ACUÑA, Y., GONZÁLEZ, F. & ALVEZ, J. 2008. Control Biológico de hormigas cortadoras (*Atta* sp. y *Acromirmex* sp.) con hongos entomopatógenos. *Revista Forestal Oriental-BIO Uruguay*. 97: 112-123.
- SANTOS, A.V., DE OLIVEIRA, B.L. & SAMUELS, R.I. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*. 163: 233-240.
- SANTOS, A.V., DILLON, R.J., DILLON, V.M., REYNOLDS, S.E. & SAMUELS, R.I. 2004. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Microbiology Letters*. 239: 319-323.
- SANTOS-OLIVEIRA, M.F.S., BUENO, O.C., MARINI, T., REISS, I.C. & BUENO, F.C. 2006. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 47(2): 423-431.
- SCOTT, J.J., BUDSBERG, K.J., SUEN, G., WIXON, D.L., BALSER, T.C. & CURRIE, C.R. 2010. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. *Public Library of Science PLoS ONE* 5(3): 1-12.
- SEIPKE, R.R., CROSSMAN, L., DROU, N., HEAVENS, D., BIBB, M.J., CACCAMO, M. & HUTCHINGS, M.I. 2011. Draft genome sequence of *Streptomyces* strain S4, a symbiont of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Journal of Bacteriology*. 193(16): 4270-4272.
- SERRANO, R., LOPEZ, F. J., HERNANDEZ, F. & PENA, J. B. 1997. Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 59: 968–975.
- SEVIM, A., DEMIRBAG, Z. & DEMIR, I. 2010. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 34: 333-342.
- SEZEN, K., DEMIR, I. & DEMIRBAG, Z. 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia*. 59: 327-331.

- SHUANG, T., QIU, X., CAO, L., HAN, R., ZHANG, Y. & LIU, X. 2010. Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 75–82.
- SCHULTZ, T.R. & BADY, S.G. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 105 (14):14 5435-5440.
- SILVA, A., RODRIGUES, A., BACCI, M., PAGNOCCA, F.C. & BUENO, O.C. 2006. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophopus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*. 162: 115-119.
- SINHA, S.N., PAL, R., DEWAN, A., MANSURI, M.M. & SAIYED, H.N. 2006. Effect of dissociation energy on ion formation and sensitivity of an analytical method for determination of 169 chlorpyrifos in human blood, using gas chromatography–mass spectrometer (GC–MS in MS/MS). *International Journal of Mass Spectrometry*. 253: 48-57.
- STATSOFT Inc. 2007. Statistics (Data Analysis Software System), Version 7. <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>
- TANADA, Y. & KAYA, H.K. 1993. Insects Pathology. Academic Press, Inc. EEUU. 666 pp.
- US EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 2000. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C.
- VALDERRAMA, I., GIRALDO, C., MONTOYA, J., ARMBRECHT, I. & CALLE, Z. 2006. Guía para el establecimiento y manejo de colonias artificiales de hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. 7(2): 9-16.
- VAN BORM, S., BILLEN, J. & BOOMSMA, J. 2002. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BioMed Central Evolutionary Biology*. 2:9.
- VÉLEZ, C. 2008. Microbiota asociada a los productos de desecho de colonias artificiales de hormiga arriera, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). Trabajo de pregrado. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia, Medellín. 43 p.
- WADDINGTON, S.J. & HUGHES, O.H. 2010. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex achinator*: the role of worker size, age and plasticity. *Behaviour Ecology Sociobiology*. 64: 1219-1228.

WANG, L. G., JIANG, X., MAO, Y. M., ZHAO, Z. H. & BIAN, Y. R. 2005. Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. *Pedosphere*. 15: 386–394.

WATERFIELD, N., DOWLING, A., SHARMA, S., DABORN, P.J., POTTER, U. & FFRENCH-CONSTANT, R.H. 2005. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5017-5024.

WILSON, E.O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*) En: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 7(2): 143-156.

WIRTH, R., HERZ, H., RYEL, R.J., BEYSCHLAG, W. & HOLLOBLER, B. 2003. Herbivory of leaf-cutting ants. Ed. Springer. Alemania. 230 pp.

WRIGHT, M.S., CONNICK, W.J. JR., JACKSON, M.A. 2003. Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. US Patent number: US6660291 B2.

ZIENTZ, E., FELDHAAR, E.H., STOLL, E.S. & GROSS, E.R. 2005. Insights into the microbial world associated with ants. *Archives of Microbiology*. 184: 199–206.