

IV Jornada de Becarios y Tesistas de la Universidad Nacional de Quilmes

**“Prueba de Viabilidad en el tiempo de cinco aislamientos de un Entomopatógeno
formulado y aplicado a Campo”**

Autores: Ema Cavallo

Dirección electrónica: emac.cavallo@gmail.com

Formación de grado (en curso): Lic. Biotecnología

Tipo de Beca: Formación Inicial en la Investigación- UNQ

Tema de Tesis: “Control biológico de hormigas cortadoras de hojas”

Director: Patricia Folgarait. **Co-director:** Claudio Valverde

Denominación del programa o proyecto en cuyo marco se inscribe la beca y/o la tesis y director del mismo: “Interacciones Biológicas: de las moléculas a las comunidades”

De corresponder, denominación del agrupamiento (instituto, centro, unidad de investigación, observatorio o laboratorio) en cuyo marco se inscribe la beca y/o la tesis y director del mismo: Laboratorio de Hormigas, Departamento de Ciencia y Tecnología, UNQ.

Resumen

Actualmente, las hormigas cortadoras de hojas (familia Formicidae, tribu Attini) constituyen una plaga en muchos países de Sudamérica, por lo cual se intenta controlar de forma racional a estos insectos, empleando distintos agentes biológicos y evitando la utilización de plaguicidas químicos sintéticos. Con este fin, se lleva adelante un proyecto de investigación con carácter de Tesis de grado, que analiza características fisiológicas y moleculares de un hongo entomopatógeno (E) de identidad confidencial, que puede ser empleado como controlador directo de las hormigas. Como parte de este proyecto, el presente trabajo analiza la viabilidad de cinco aislamientos de dicho hongo (E3, E4, E5, E6 y E7) con el objetivo principal de evaluar si la misma disminuye en orden de magnitud entre su aplicación y las 48 horas de exposición a la intemperie. Para ello, se realizaron tres tipos de formulados llamados FA, FB y FC (carácter confidencial) para cada uno de los cinco aislamientos de E, y se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas de exposición a la intemperie, analizando la recuperación de Unidades Formadoras de Colonias en placa. Se demostró que la viabilidad no varió en orden de magnitud para los distintos tiempos aunque el formulado FA presentó, desde el principio, menor viabilidad en comparación a FB y FC, no obstante, todos la mantuvieron en el tiempo. Por lo tanto, todos cumplen con los requisitos necesarios para su uso como controladores biológicos, ya que las hormigas los acarrearán durante las primeras 24 horas de aplicados a campo.

Introducción

Comúnmente se han utilizado pesticidas químicos para combatir las hormigas cortadoras de hojas (familia Formicidae, tribu Attini) en especial de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, lo cual resulta tóxico para el ambiente. Más aún, en muchos casos suele no ser efectivo, debido a que los pesticidas no son específicos y provocan un efecto negativo sobre los enemigos naturales de las hormigas [2], además que no llegan a matar a la reina del hormiguero, lo cual lleva a que la colonia se recupere rápidamente [1]. Por estas causas y otras negativas para el ambiente y la salud humana, hoy en día se intenta combatir a estos insectos sociales por medio del uso de agentes biológicos. Entre éstos se encuentran hongos oportunistas como los entomopatógenos, categoría a la cual pertenece el microorganismo aquí estudiado (división Ascomycota, orden Hypocreales) llamado E de aquí en adelante, por cuestiones confidenciales.

En el marco de un proyecto de Tesis, se ha estudiado previamente la patogenicidad de siete aislamientos de E sobre la hormiga plaga *Acromyrmex lundii*, obteniéndose resultados prometedores de estos aislamientos como potenciales biocontroladores. De ellos, se han seleccionado cinco aislamientos (E3, E4, E5, E6 y E7) como los mejores candidatos, razón por la cual fueron los empleados en las pruebas de viabilidad a campo. Actualmente, el Laboratorio de Hormigas cuenta con tres tipos de formulados de carácter confidencial (FA, FB y FC) para la aplicación de E. Con vistas a la aplicación directa de estos formulados se ensayaron los cinco candidatos de E en las tres formulaciones para evaluar la mejor combinación en el uso del biocontrolador. Para ello, se estudió la viabilidad de los aislamientos a las 24 y 48 horas posteriores a la exposición en intemperie. Debe resaltarse que una vez aplicado a campo, las hormigas acarrearán prácticamente todo el formulado en

24 horas y sólo en raras ocasiones pueden permanecer en el sitio de aplicación a las 48 horas. Debido a ello, carece de sentido práctico probar la viabilidad por fuera de este tiempo. Así, el presente trabajo ilustra las pruebas de viabilidad de estos cinco aislamientos de E en sus tres formulaciones como parte del estudio fisiológico de este hongo y con miras a su aplicación como biocontrolador.

Objetivos

1. Evaluar la viabilidad de cinco aislamientos de un entomopatógeno en tres formulados distintos a las 24 y 48 horas posteriores a su aplicación;
2. Determinar si alguno de los aislamientos presenta mayor resistencia a condiciones de campo;
3. Evaluar si existe algún efecto de los distintos formulados sobre los aislamientos.

Metodología

Se utilizaron cinco aislamientos de un entomopatógeno (E3, E4, E5, E6 y E7), seleccionados a partir de resultados de ensayos previos de patogenicidad sobre hormigas cortadoras. Para cada aislamiento del hongo a probar, se inoculó 1 ml de 10^5 conidios/ml, contados en cámara de Neubauer, en 100 gr de arroz autoclavado. Cada inoculación se dejó crecer y al cabo de 10 días, se procedió a su formulación. Dichos formulados fueron guardados posteriormente en heladera a tapa cerrada durante dos días hasta su uso. Para medir la viabilidad a T=0; T=1 (24 hrs) y T=2 (48 hrs) se pesó 1 gr de formulado y se resuspendió en 10 ml de Tween 0,01%. Luego se hicieron diluciones seriadas 1/10 hasta las diluciones -5 o -6 dependiendo el caso. Finalmente, se plaquearon 100 μ l de la última

dilución y se contaron las UFC a las 48 y 72 hrs. Para cada aislamiento con cada formulado se realizaron seis réplicas en los tres tiempos, tomando muestras de una misma partida de formulado. Los ensayos fueron llevados a cabo en días con una humedad no mayor al 85% y las placas fueron crecidas en laboratorio a una temperatura promedio de 23°C.

Los resultados fueron analizados calculando la mediana y los cuartiles (Q_{25} y Q_{75}) para las seis réplicas en cada caso. Estos datos fueron plasmados en gráficos de barras con sus respectivos errores según los cuartiles. Los resultados se analizaron estadísticamente con Kruskal-Wallis, empleando el paquete Systat 13. Para ello, se estudió por aislamiento, agrupando los datos por Tiempo: T=0; T=24; T=48 hrs (Aislamiento fijo; formulado fijo; variable de comparación: Tiempo) En todos los casos la variable continua de análisis fue UFC/gr. En cada análisis se aplicó la corrección de Bonferroni al α , según la cantidad de datos a comparar.

Resultados

A) Análisis por aislamiento

A continuación se muestran los resultados obtenidos ordenados por aislamiento. Se presentan las medianas y los desvíos según los cuartiles en cada caso.

E3

En la *tabla 1* se muestran los resultados para los tres formulados de E3, donde se observan las medianas, sus respectivos errores y el número de réplicas final. En el *gráfico 1* se encuentran plasmados los mismos datos.

Formulado	Tiempo	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅	N° réplicas
E3 FA	T0	3.50E+08	2.70E+08	5.10E+08	5
E3 FA	T1=24 hrs	1.80E+08	1.60E+08	1.90E+08	5
E3 FA	T2=48 hrs	4.04E+08	3.29E+08	6.85E+08	6
E3 FB	T0	1.13E+09	1.02E+09	1.21E+09	6
E3 FB	T1=24 hrs	9.46E+08	8.81E+08	9.84E+08	6
E3 FB	T2=48 hrs	1.20E+09	1.01E+09	1.48E+09	6
E3 FC	T0	4.00E+08	3.73E+08	4.88E+08	6
E3 FC	T1=24 hrs	2.75E+08	2.40E+08	3.93E+08	6
E3 FC	T2=48 hrs	1.96E+08	1.87E+08	2.41E+08	6

Tabla 1: Resultados para E3

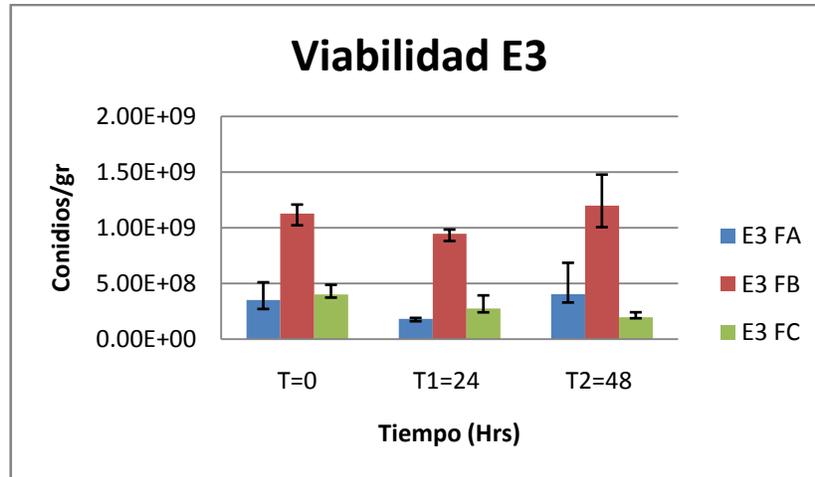


Gráfico 1: Resultados de Viabilidad para B3

El primer análisis que puede realizarse es el estudio de la viabilidad para cada formulado dentro del mismo aislamiento, en este caso E3, comparando a cada tiempo. Para ello, se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis con un $\alpha = 0,016$. En la *tabla 2* se muestran los resultados obtenidos.

	E3 FA		E3 FB		E3 FC	
Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	
T=0 vs T=1	0.031 NS	T=0 vs T=1	0.073 NS	T=0 vs T=1	0.076 NS	
T=0 vs T=2	0.562 NS	T=0 vs T=2	0.791 NS	T=0 vs T=2	0.001 S*	
T=1 vs T=2	0.008 S*	T=1 vs T=2	0.036 NS	T=1 vs T=2	0.05 NS	

Tabla 2: Análisis estadístico para B3 (formulado fijo). NS: No Significativo; S*: significativo. $\alpha=0.016$

De la *tabla 2* puede verse que en el caso de FB no hay diferencia significativa para ninguna de las tres mediciones en el tiempo. En el caso de FA existe una diferencia significativa entre la viabilidad en T=1 y T=2, siendo T=1 un poco menor que T=2. Observando el gráfico, se observa en este caso que la viabilidad disminuye ligeramente en T=1 y vuelve a recuperar en T=2 el valor prácticamente igual al de T=0. Sin embargo, T=1 no puede considerarse distinto de T=0, que a su vez es estadísticamente igual a T=2. Esto indicaría

que no debería haber una diferencia real en la viabilidad entre los tiempos mencionados. Por otra parte, en FC, se observa gráficamente una tendencia a disminuir la viabilidad en el tiempo. En este caso, se comprueba con el análisis estadístico una disminución significativa entre FC T=0 y T=2, pero no con T=1. Dicha disminución es, sin embargo, pequeña debido a que no varía el orden en la cantidad de UFC/gr, pero se hace evidente debido a que las barras de error son muy pequeñas en T=2.

E4

En la *tabla 3* y el *gráfico 2* se muestran los datos obtenidos al trabajar con el aislamiento E4.

Formulado	Tiempo	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅	N° réplicas
E4 FA	T0	1.58E+08	1.50E+08	1.99E+08	6
E4 FA	T1=24 hrs	2.60E+08	2.25E+08	2.74E+08	6
E4 FA	T2=48 hrs	1.27E+08	8.53E+07	1.78E+08	6
E4 FB	T0	1.87E+08	1.79E+08	2.01E+08	6
E4 FB	T1=24 hrs	1.67E+08	1.39E+08	1.82E+08	6
E4 FB	T2=48 hrs	2.39E+08	2.20E+08	2.96E+08	6
E4 FC	T0	3.65E+08	2.16E+08	4.36E+08	6
E4 FC	T1=24 hrs	2.35E+08	2.17E+08	2.92E+08	6
E4 FC	T2=48 hrs	2.59E+08	1.97E+08	2.77E+08	6

Tabla 3 Resultados para E4

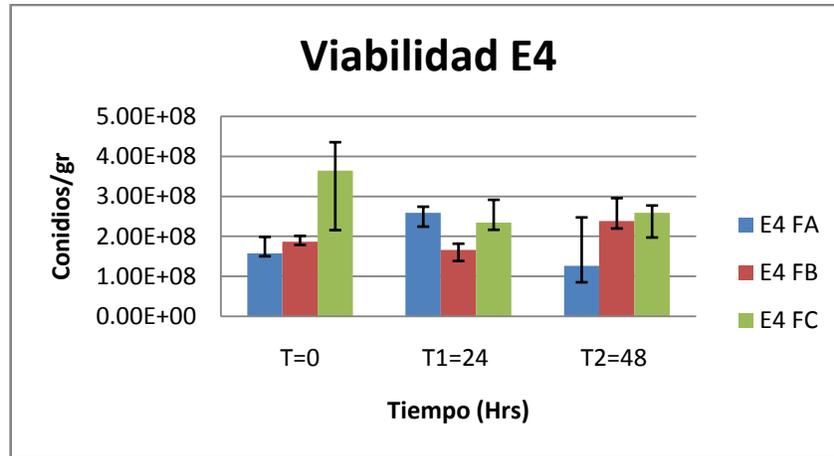


Gráfico 2: Resultados de viabilidad para B4

Tal como se realizó en el caso anterior, se estudió la viabilidad para cada formulado dentro del mismo aislamiento, en este caso E4, comparando a cada tiempo. Para ello, se utilizó el análisis de Kruskal Wallis con un $\alpha = 0,016$. En la *tabla 4* se muestran los resultados obtenidos.

	E4 FA		E4 FB		E4 FC	
Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	
T=0 vs T=1	0.097 NS	T=0 vs T=1	0.238 NS	T=0 vs T=1	0.543 NS	
T=0 vs T=2	0.189 NS	T=0 vs T=2	0.09 NS	T=0 vs T=2	0.448 NS	
T=1 vs T=2	0.007 S*	T=1 vs T=2	0.008 S*	T=1 vs T=2	0.878 NS	

Tabla 4: Análisis estadístico para E4 (formulado fijo). NS: No Significativo; S*: significativo. $\alpha=0.016$

Analizando la *tabla 4* y el *gráfico 2*, puede determinarse que no hay un aumento ni una disminución de la viabilidad significativos en FC a lo largo del tiempo. Sin embargo, similar a lo ocurrido al analizar E3, se ve que hay una diferencia significativa entre T=1 y T=2 para FA y FB, pero no al comparar ninguno de los dos con T=0. Para FA, la viabilidad disminuye hacia T=2, mientras que para FB aumenta, en relación a T=1. Es probable, nuevamente, interpretar que en realidad no ocurren cambios significativos en la viabilidad,

ya que T=0 es estadísticamente igual a T=2, que además es la comparación más importante para evaluar la viabilidad. Si en T=1 la viabilidad varía, o si en T=2 la viabilidad aumenta no parece ser relevante a los fines prácticos, debido a que justamente puede interpretarse como posibles errores experimentales o un artefacto de la técnica empleada, o bien, por heterogeneidad propia del formulado, lo cual se ve luego reflejado en el conteo en placa.

B5

En la *tabla 5* y el *gráfico 3* se muestran los promedios para E5 con sus respectivos desvíos.

Formulado	Tiempo	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅	N° réplicas
E5 FA	T0	1.40E+08	1.05E+08	1.68E+08	4
E5 FA	T1=24 hrs	1.00E+08	8.00E+07	1.42E+08	5
E5 FA	T2=48 hrs	2.77E+08	2.72E+08	2.85E+08	5
E5 FB	T0	7.24E+08	7.04E+08	7.56E+08	5
E5 FB	T1=24 hrs	6.40E+08	6.18E+08	6.71E+08	4
E5 FB	T2=48 hrs	4.73E+08	3.59E+08	5.64E+08	6
E5 FC	T0	1.89E+09	1.59E+09	3.01E+09	5
E5 FC	T1=24 hrs	1.23E+09	1.16E+09	1.28E+09	4
E5 FC	T2=48 hrs	9.00E+08	6.90E+08	1.02E+09	6

Tabla 5 resultados para E5

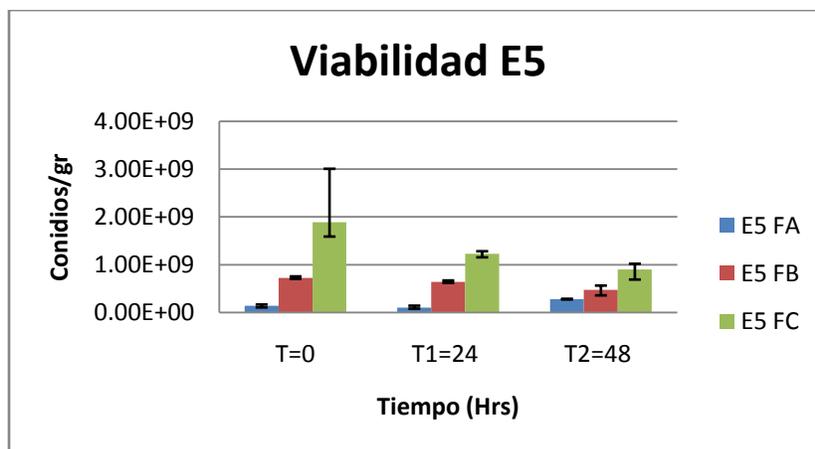


Gráfico 3 Resultados de viabilidad para E5

En la *tabla 6* se muestran los resultados de los análisis estadísticos al analizar por aislamiento.

E5 FA		E5 FB		E5 FC	
Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	Análisis	Valor p
T=0 vs T=1	0.285 NS	T=0 vs T=1	0.032 NS	T=0 vs T=1	0.353 NS
T=0 vs T=2	0.003 S*	T=0 vs T=2	0.000 S*	T=0 vs T=2	0.009 S*
T=1 vs T=2	0.000 S*	T=1 vs T=2	0.001 S*	T=1 vs T=2	0.078 NS

Tabla 6: Análisis estadístico para E5 (formulado fijo). NS: No Significativo; S*: significativo. $\alpha=0.016$

Para el formulado FA no hay diferencias significativas entre los T=0 y T=1, pero sí habría una diferencia al comparar ambos con T=2, donde la viabilidad pareciera aumentar hacia T=2, según se muestra en el *gráfico 3*. En el caso de FB el resultado es el mismo que para FA con respecto al análisis estadístico, aunque lo que ocurre en este caso es una leve disminución de la viabilidad hacia T=2 en lugar de un aumento. En el caso de FC se observa una disminución en la viabilidad, pero como T=1 es estadísticamente igual a T=2, esa disminución sería evidente entonces en T=1 al comparar con T=0.

E6

La *tabla 7* y el *gráfico 4* muestran los resultados obtenidos para E6 en cuanto a los promedios y desvíos para los tres formulados en los tres tiempos y el número de réplicas.

Formulado	Tiempo	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅	N° réplicas
E6 FA	T0	1.90E+08	1.75E+08	2.95E+08	6
E6 FA	T1=24 hrs	1.28E+08	1.19E+08	1.36E+08	5
E6 FA	T2=48 hrs	1.99E+08	1.88E+08	2.07E+08	6
E6 FB	T0	7.68E+08	7.53E+08	9.45E+08	6
E6 FB	T1=24 hrs	9.86E+08	9.14E+08	9.95E+08	6
E6 FB	T2=48 hrs	1.02E+09	8.74E+08	1.17E+09	6
E6 FC	T0	4.50E+08	4.30E+08	8.40E+08	5
E6 FC	T1=24 hrs	1.35E+08	9.50E+07	1.68E+08	6
E6 FC	T2=48 hrs	1.95E+08	1.88E+08	2.95E+08	5

Tabla7: Resultados E6

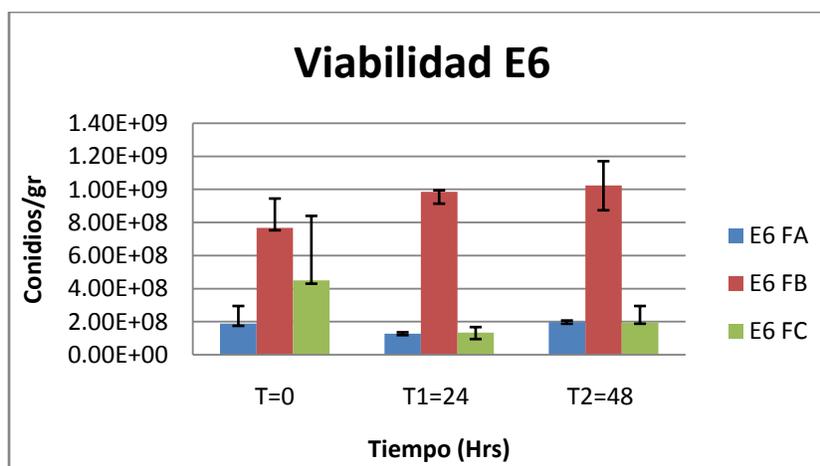


Gráfico 4 Resultados de viabilidad para E6

En la *tabla 8* se especifican los valores de p obtenidos para los análisis estadísticos realizados al comparar el mismo aislamiento, dentro del mismo formulado a distintos tiempos.

E6 FA		E6 FB		E6 FC	
Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	Análisis	Valor p
T=0 vs T=1	0.025 NS	T=0 vs T=1	0.318 NS	T=0 vs T=1	0.000 S*
T=0 vs T=2	0.683 NS	T=0 vs T=2	0.178 NS	T=0 vs T=2	0.000 S*
T=1 vs T=2	0.011 S*	T=1 vs T=2	0.709 NS	T=1 vs T=2	0.000 S*

Tabla 83 Análisis estadístico para B6 (formulado fijo). NS: No Significativo; S*: significativo. $\alpha=0.016$

En el caso de FA se observa que la viabilidad disminuye levemente en T=1, aunque sin mostrar diferencias significativas con T=0, y luego se recupera la viabilidad en T=2, no teniendo este último diferencias significativas con T=0 pero sí con T=1. Esto se debe probablemente a que las barras de error de T=0 son mayores que las de T=1 y T=2, por lo cual ninguno de los dos muestra diferencias con T=0 pero sí entre ellos. En el caso de FB, a ninguno de los tres tiempos se muestran diferencias significativas, por lo cual no puede decirse que haya una variación estadística en la viabilidad. Sin embargo, en el caso de FC, los tres tiempos muestran diferencias significativas entre ellos. En este caso lo que ocurre, observando el *gráfico 4*, es que la viabilidad disminuye en T=1 y aumenta levemente en T=2 al comparar con T=1. Si bien existe una diferencia significativa entre T=1 y T=2, puede considerarse que la real diferencia está entre ambos en comparación T=0, ya que la viabilidad entre T=1 y T=2 es bastante cercana y, de hecho, en T=2 aumenta, lo cual puede deberse a alguna de las causas mencionadas anteriormente.

E7

La *tabla 9* y el *gráfico 5* muestran los valores de promedio y desvío para el aislamiento E7.

En la *tabla 10* se encuentran los resultados de los análisis estadísticos realizados.

Formulado	Tiempo	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅	N° réplicas
E7 FA	T0	5.40E+08	4.00E+08	9.70E+08	5
E7 FA	T1=24 hrs	1.94E+08	1.85E+08	2.20E+08	5
E7 FA	T2=48 hrs	1.99E+08	1.89E+08	2.06E+08	6
E7 FB	T0	7.56E+08	7.22E+08	7.87E+08	6
E7 FB	T1=24 hrs	8.02E+08	6.78E+08	9.92E+08	6
E7 FB	T2=48 hrs	7.40E+08	7.20E+08	7.60E+08	5
E7 FC	T0	1.02E+09	8.25E+08	1.12E+09	6
E7 FC	T1=24 hrs	1.29E+09	1.17E+09	1.34E+09	5
E7 FC	T2=48 hrs	1.26E+09	1.14E+09	1.33E+09	6

Tabla 9: Resultados E7

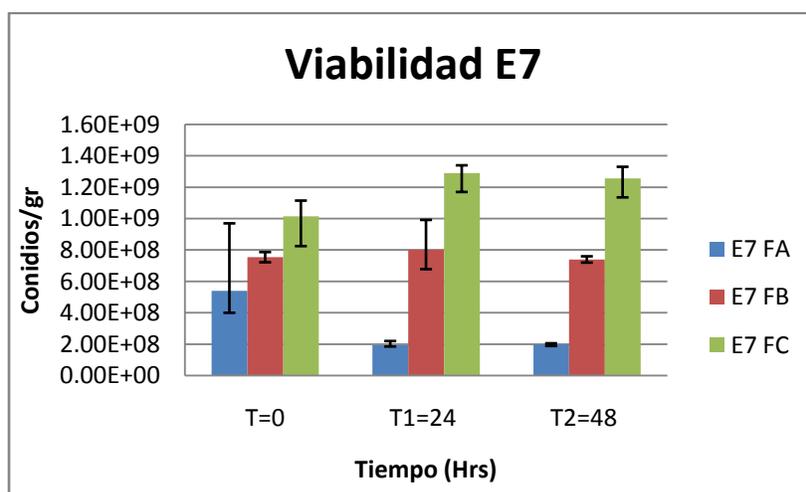


Gráfico 5: Resultados viabilidad E7

	E7 FA		E7 FB		E7 FC	
Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	Análisis	Valor p	
T=0 vs T=1	0.005 S*	T=0 vs T=1	0.751 NS	T=0 vs T=1	0.068 NS	
T=0 vs T=2	0.003 S*	T=0 vs T=2	0.916 NS	T=0 vs T=2	0.064 NS	
T=1 vs T=2	0.848 NS	T=1 vs T=2	0.683 NS	T=1 vs T=2	0.953 NS	

Tabla 10 Análisis estadístico para B7 (formulado fijo). NS: No Significativo; S*: significativo. $\alpha=0.016$

En este caso, para los formulados FB y FC las diferencias entre los distintos tiempos, dentro de un mismo formulado son no significativas, por lo cual, se puede afirmar que la viabilidad aquí no varía. Sin embargo, en el caso de FA, se observa que la viabilidad disminuye en el tiempo, según el *gráfico 5*, y que las diferencias entre T=0 y los otros dos tiempos son significativas, pero no entre T=1 y T=2. Esto implica que la disminución de viabilidad más importante se produce a las 24 hrs y luego se mantendría constante.

B) Análisis por Formulado

Luego de haber analizado los datos por aislamiento, se procedió a juntar los resultados por formulado y a contrastar entre los distintos aislamientos los datos de viabilidad a un tiempo dado. Las *tablas 11, 12 y 13* muestran los mismos resultados presentados anteriormente, pero esta vez agrupados e identificados con código de colores según lo que se presenta en los respectivos gráficos.

FA

Viabilidad FA				
Aislamiento	Tiempo (hrs)	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅
E3	T=0	3.50E+08	2.70E+08	5.10E+08
E3	T1=24	1.80E+08	1.60E+08	1.90E+08
E3	T2=48	4.04E+08	3.29E+08	6.85E+08
E4	T=0	1.58E+08	1.50E+08	1.99E+08
E4	T1=24	2.60E+08	2.25E+08	2.74E+08
E4	T2=48	1.27E+08	8.53E+07	1.78E+08
E5	T=0	1.40E+08	1.05E+08	1.68E+08
E5	T1=24	1.00E+08	8.00E+07	1.42E+08
E5	T2=48	2.77E+08	2.72E+08	2.85E+08
E6	T=0	1.90E+08	1.75E+08	2.95E+08
E6	T1=24	1.28E+08	1.19E+08	1.36E+08
E6	T2=48	1.99E+08	1.88E+08	2.07E+08
E7	T=0	5.40E+08	4.00E+08	9.70E+08
E7	T1=24	1.94E+08	1.85E+08	2.20E+08
E7	T2=48	1.99E+08	1.89E+08	2.06E+08

Tabla 11: Resultados de viabilidad en FA

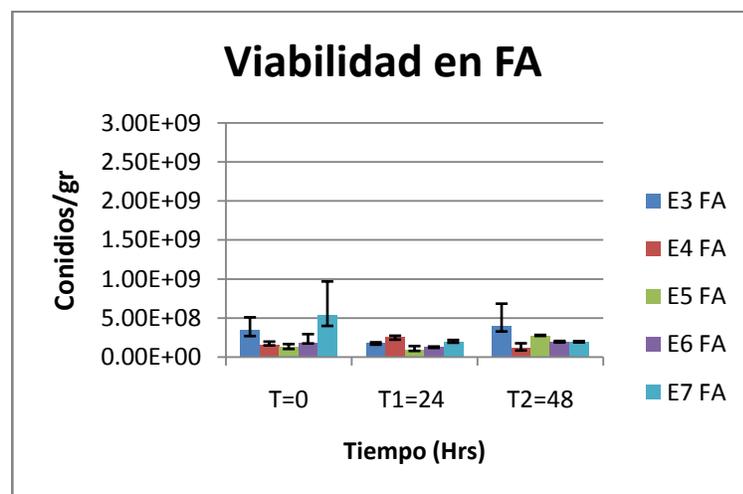


Gráfico 6 Viabilidad conjunta en FA

FB

Viabilidad FB				
Aislamiento	Tiempo (hrs)	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅
E3	T=0	1.13E+09	1.02E+09	1.21E+09
E3	T1=24	9.46E+08	8.81E+08	9.84E+08
E3	T2=48	1.20E+09	1.01E+09	1.48E+09
E4	T=0	1.87E+08	1.79E+08	2.01E+08
E4	T1=24	1.67E+08	1.39E+08	1.82E+08
E4	T2=48	2.39E+08	2.20E+08	2.96E+08
E5	T=0	7.24E+08	7.04E+08	7.56E+08
E5	T1=24	6.40E+08	6.18E+08	6.71E+08
E5	T2=48	4.73E+08	3.59E+08	5.64E+08
E6	T=0	7.68E+08	7.53E+08	9.45E+08
E6	T1=24	9.86E+08	9.14E+08	9.95E+08
E6	T2=48	1.02E+09	8.74E+08	1.17E+09
E7	T=0	7.56E+08	7.22E+08	7.87E+08
E7	T1=24	8.02E+08	6.78E+08	9.92E+08
E7	T2=48	7.40E+08	7.20E+08	7.60E+08

Tabla 12: resultados de viabilidad en FB

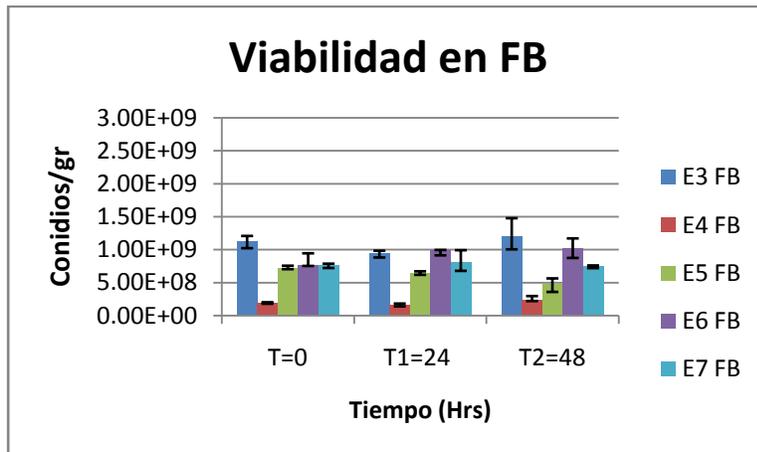


Gráfico 7 Viabilidad conjunta en FB

FC

Viabilidad FC				
Aislamiento	Tiempo (hrs)	Mediana (UFC/gr)	Q ₂₅	Q ₇₅
E3	T=0	4.00E+08	3.73E+08	4.88E+08
E3	T1=24	2.75E+08	2.40E+08	3.93E+08
E3	T2=48	1.96E+08	1.87E+08	2.41E+08
E4	T=0	3.65E+08	2.16E+08	4.36E+08
E4	T1=24	2.35E+08	2.17E+08	2.92E+08
E4	T2=48	2.59E+08	1.97E+08	2.77E+08
E5	T=0	1.89E+09	1.59E+09	3.01E+09
E5	T1=24	1.23E+09	1.16E+09	1.28E+09
E5	T2=48	9.00E+08	6.90E+08	1.02E+09
E6	T=0	4.50E+08	4.30E+08	8.40E+08
E6	T1=24	1.35E+08	9.50E+07	1.68E+08
E6	T2=48	1.95E+08	1.88E+08	2.95E+08
E7	T=0	1.02E+09	8.25E+08	1.12E+09
E7	T1=24	1.29E+09	1.17E+09	1.34E+09
E7	T2=48	1.26E+09	1.14E+09	1.33E+09

Tabla 13: resultados de viabilidad en FC

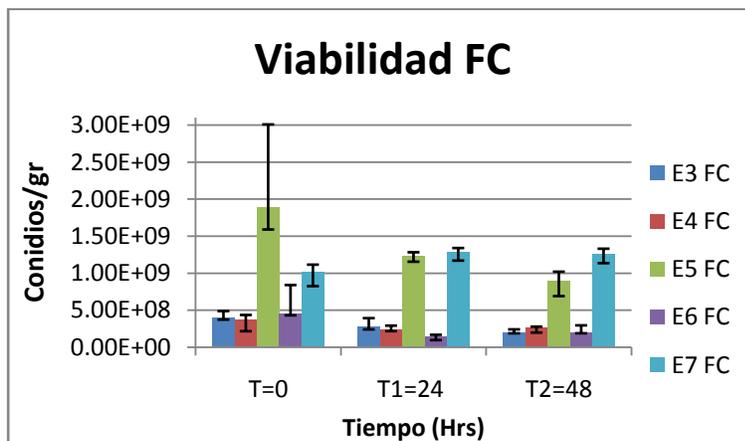


Gráfico 8: viabilidad conjunta en FC.

Observando los *gráficos 6, 7 y 8* pareciera que en los formulados FA y FB las viabilidades son bastante más parejas entre aislamientos y entre tiempos que en comparación con FC. La diferencia principal entre FA y FB está en el orden de UFC/gr: mientras que FA ronda los 10^8 UFC/gr, FB está más cercano a 10^9 UFC/gr. En este último caso E4 constituye una excepción, ya que es un aislamiento bastante distinto a los demás en cuanto que pareciera crecer más lento tanto en estas experiencias como en anteriores (obsérvese que en FB está por debajo de 5×10^8). Por otra parte, FC muestra en general valores más similares a FB pero se observa que E5 y E7 tienen una mayor viabilidad en este formulados, efecto no visto en FB.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados presentados anteriormente, se resaltarán algunas conclusiones y se discutirán algunos puntos. Para poder clarificar los datos, se presenta la *tabla 14* donde se muestra un resumen de los análisis estadísticos, sumado a los gráficos realizados, para el análisis dentro de un mismo formulado y comparando un solo aislamiento en los tres tiempos.

Tabla14: Resumen de resultados para un mismo formulado y aislamiento

	FA	FB	FC
E3	T1=T0	NS	T1=T0
	T2=T0	NS	T0>T2
	T2>T1	NS	T2=T1
E4	T1=T0	T1=T0	NS
	T2=T0	T2=T0	NS
	T1>T2	T2>T1	NS
E5	T1=T0	T1=T0	T1=T0
	T2>T0	T0>T2	T0>T2
	T2>T1	T1>T2	T2=T1
E6	T1=T0	NS	T0>T1
	T2=T0	NS	T0>T2
	T2>T1	NS	T2>T1
E7	T0>T1	NS	NS
	T0>T2	NS	NS
	T2=T1	NS	NS

Evaluando la *tabla 14* (color rojo), se ve que en la mayoría de los casos las diferencias no son significativas al comparar distintos tiempos en un mismo formulado y aislamiento. De los casos restantes en algunas ocasiones se ve una disminución leve de la viabilidad (negrita), mientras que en otros la viabilidad aumenta (color verde) o se encuentra combinaciones de estas

situaciones. Como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a artefactos propios de la técnica, la heterogeneidad de los formulados, o un efecto sinérgico entre ambos. De esta manera, se puede concluir que *no existe una pérdida de viabilidad en 48 horas de exposición a condiciones de intemperie al comparar el orden de magnitud*, cumpliendo así con los objetivos principales de este trabajo. Asimismo, si se tiene en cuenta los resultados

de patogenicidad obtenidos previamente, se puede concluir, además, que los cinco aislamientos de E seleccionados son buenos candidatos como biocontroladores.

Finalmente, teniendo en cuenta que al comparar los resultados de los tres formulados FA mostró, en líneas generales, menor número de viables desde T=0, se eligen los formulados FB y FC como mejores opciones a la hora de su aplicación a campo, con cualquiera de los cinco aislamientos.

Bibliografía

- [1] Folgarait P.J. *et al* (2011) “Preliminary *in vitro* insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents” *Curr. Microbiol.* Publicación online DOI 10.1007/s00284-011-9944-y
- [2] Guillade A.C. & Folgarait P.J. (2014) “Natural enemies of *Atta vollenweideri* leafcutter ants negatively affected by synthetic pesticides, chlorpyrifos and fipronil” *J. Econ. Entomol.*